

Substratbindung und -freigabe während des Katalysezyklus eines biotinspezifischen ECF-Transporters

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Friedrich Finkenwirth

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Eitinger
2. Prof. Dr. Erwin Schneider
3. Prof. Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2017

Vorwort

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Eitinger am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Die Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Finkenwirth, F.; Sippach, M.; Landmesser, H.; Kirsch, F.; Ogienko, A.; Grunzel, M.; Kiesler, C.; Steinhoff, H.-J.; Schneider, E. und Eitinger, T. (2015): ATP-dependent Conformational Changes Trigger Substrate Capture and Release by an ECF-type Biotin Transporter. *J Biol Chem*, 290(27), 16929–16942.

Finkenwirth, F.; Kirsch, F. und Eitinger, T. (2014): A versatile *Escherichia coli* strain for identification of biotin transporters and for biotin quantification. *Bioengineered*, 5(2), 129-132.

Finkenwirth, F.; Kirsch, F. und Eitinger, T. (2013): Solitary BioY proteins mediate biotin transport into recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 195(18), 4105–4111.

Zusammenfassung

ECF (*Energy-Coupling Factor*)-Transporter sind prokaryotische Aufnahmesysteme für Mikronährstoffe und stellen eine spezielle Gruppe von Transportern mit ATP-Bindekassette (ABC) dar. Anders als kanonische ABC-Transporter beinhalten sie zwei asymmetrische Membranproteine, von denen eines (S) für die spezifische Bindung und Translokation des Substrates und das andere (T) für die Kopplung mit den ABC-ATPasen (A1, A2) zuständig ist. Bei ECF-Transportern der Subklasse I bilden diese Komponenten eine Einheit, während bei Vertretern der Subklasse II ein universelles A1A2T-Modul mit wechselnden S-Einheiten interagiert. Der hypothetische Transportmechanismus, der eine Drehung der kompletten S-Einheit in der Membran beinhaltet, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand des in Lipid-Nanodiscs rekonstituierten Biotintransporters BioM₂NY experimentell validiert. Analysen zur Dynamik mithilfe chemischer Quervernetzung, fluoreszenz- und ESR-spektroskopischer Techniken sowie ein Substratbindungstest mit radioaktivem Biotin zeigten, dass (i) die ATP-Bindung an die ATPasen zu einer aufrichtenden Drehbewegung der S-Einheit (BioY) in der Membran führt, (ii) diese Aufrichtung die Substratbeladung ermöglicht und (iii) BioY währenddessen ununterbrochen mit der T-Einheit (BioN) interagiert. Wichtig für den Kontakt sind räumlich benachbarte kleine hydrophobe Aminosäurereste in der ersten transmembranen Helix von BioY, ein Motiv, das bei S-Einheiten beider Subklassen verbreitet ist. Im Gegensatz zu Systemen der Subklasse II, für die ein ATP-abhängiger Austausch von S-Einheiten im Transportzyklus gezeigt worden war, bleibt der Komplex aus BioM₂NY, einem Vertreter der Subklasse I, in allen Phasen des Zyklus stabil. In einem weiteren Schwerpunkt der Arbeit wurde ein *Escherichia coli*-Stamm konstruiert, der durch Blockierung der Biotinsynthese und Entfernung seines intrinsischen hochaffinen Biotintransporters auf Biotin in Spurenkonzentrationen nicht mehr wachsen kann. Mithilfe dieses Stammes wurde die vermutete Biotintransportaktivität solitärer BioY-Proteine, deren Ursprungsorganismen keine A- und T-Komponenten besitzen, experimentell bestätigt. Aufgrund der einheitlichen Topologie von S-Einheiten ist ein Kippen auch für solitäre BioY-Varianten wahrscheinlich. Diese Eigenschaft teilen sie mit den metallspezifischen S-Einheiten CbiM und NikM, die ohne ihr A1A2T-Modul basale Co²⁺- bzw. Ni²⁺-Transportaktivität besitzen. Zur Beladung mit Metallionen benötigen diese S-Einheiten allerdings die nur zwei Transmembranhelices enthaltenden Komponenten CbiN bzw. NikN, was für das CbiM-CbiN-Paar durch einen ESR-spektroskopischen Kobaltnachweis gezeigt werden konnte.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1. Einleitung	12
1.1 Transport über biologische Membranen	12
1.2 ABC-Transporter	12
1.2.1 Verbreitung und Bedeutung von ABC-Transportern	12
1.2.2 Klassifizierung und grundlegender Aufbau von ABC-Transportern	14
1.2.3 Struktur kanonischer ABC-Importer	16
1.2.4 Transportmechanismus kanonischer ABC-Importer.....	20
1.3 ECF-Transporter	22
1.3.1 Klassifizierung von ECF-Transportern	23
1.3.2 Struktur und Funktion von S-Einheiten	24
1.3.3 Struktur ganzer ECF-Transporter	26
1.3.4 Ein hypothetisches Transportmodell für ECF-Transporter	29
1.3.5 Transport durch solitäre S-Einheiten.....	31
1.4 Zielstellung der Arbeit	31
2. Ergebnisse	33
2.1 Ein Indikatorstamm zum Nachweis der Transportaktivität modifizierter Biotintransporter	33
2.1.1 Konstruktion und Charakterisierung eines biotinauxotrophen und – aufnahmedefizienten Indikatorstammes.....	33
2.1.2 <i>E. coli</i> $\Delta bioH \Delta yigM::km$ als Referenzstamm zum Nachweis von Biotintransportprozessen	37
2.1.3 Transportaktivität solitärer BioY-Proteine ohne ECF-Modul.....	38
2.2 Strukturmodell des Biotintransporters BioM ₂ NY aus <i>R. capsulatus</i>	40
2.3 Analyse der Substratbeladung von BioM ₂ NY mithilfe LC-gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS).....	43
2.4 Funktionelle Rekonstitution und Charakterisierung des Biotintransporters BioM ₂ NY in Nanodiscs	44
2.5 Schließen und Öffnen des BioM-Dimers als Folge der ATP-Bindung und -Hydrolyse	46
2.6 Identifikation eines Interaktionsmotivs in BioY	49
2.7 Analyse der Transportfunktion veränderter BioM ₂ NY-Varianten.....	51
2.8 Ortsspezifische Quervernetzung von BioN und BioY	54
2.9 Die Bindung von ATP an BioM führt zur Aufrichtung von BioY	58

2.10	Die ATP-induzierte Aufrichtung von BioY führt zur Substratbindung.....	62
2.11	Analyse der Komplexstabilität von BioM ₂ NY in Abhängigkeit von Liganden	64
2.12	Bedeutung der Q-Helix in BioM für die Stabilisierung der ATP-Beladung.....	68
2.13	Die Rolle von CbiN für die Substratbeladung der kobaltspezifischen S-Einheit CbiM	72
3.	Diskussion.....	76
3.1	Biotin und Biotintransport	76
3.2	Solitäre BioY-Proteine als funktionelle Biotintransporter	79
3.3	Die S-Einheit als zentrales Element im Mechanismus von ECF-Transportern	81
3.4	Die Rolle von ATP im Transportmechanismus von BioM ₂ NY	88
3.5	Mechanistische Unterschiede zwischen ECF-Transportern der Subklassen I und II.....	101
4.	Material und Methoden	106
4.1	Stämme.....	106
4.2	Plasmide	106
4.3	Kultivierung von Bakterienstämmen	109
4.3.1	Nährmedien	109
4.3.2	Antibiotika.....	110
4.3.3	Bestimmung der Zelldichte	110
4.3.4	Aufzeichnung des bakteriellen Wachstumsverlaufes.....	110
4.4	Konservierung von Bakterienstämmen	111
4.5	DNA-Isolierung	111
4.5.1	Isolierung von Gesamt-DNA nach Chen & Kuo	111
4.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	111
4.6	Enzymatische Modifikation von DNA	112
4.6.1	Polymerasekettenreaktion	112
4.6.2	Restriktion	116
4.6.3	Ligation	116
4.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	117
4.8	Reinigung von PCR-Produkten und anderen DNA-Fragmenten	117
4.9	Herstellung chemisch kompetenter Zellen und Transformation.....	117
4.10	DNA-Sequenzierung.....	118
4.11	Konstruktion der Plasmide.....	118
4.11.1	Herstellung von BioM ₂ NY-Varianten aus <i>A. tumefaciens</i> und <i>S. meliloti</i> mit C-terminalem cMyc-Tag an BioN	118
4.11.2	Erzeugung von Aminosäureaustauschen.....	119
4.12	λRed-vermittelte Rekombination zur Erzeugung chromosomaler Mutationen	122

4.12.1	Bereitstellung und Induktion der λ Red-Gene.....	122
4.12.2	Elektroporation und Selektion von Rekombinanten	123
4.12.3	Entfernung der Resistenzkassette durch Flp-abhängige Rekombination ...	123
4.13	Isolierung von Membranproteinen.....	124
4.13.1	Zellanzucht und Ernte	124
4.13.2	Zellaufschluss und Separation von Membranvesikeln.....	125
4.13.3	Solubilisierung von Membranproteinen.....	125
4.13.4	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	126
4.13.5	Reinigung über Ni-NTA-Agarose.....	126
4.13.6	Reinigung über Strep-Tactin Superflow	127
4.14	Umpuffern von Proteinlösungen	127
4.15	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	127
4.15.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	127
4.15.2	Proteinbestimmung mit BCA (Bicinchoninsäure)	128
4.15.3	Proteinbestimmung nach Lowry	128
4.15.4	Proteinbestimmung mittels Infrarot-Spektrometer.....	129
4.16	Konzentrationserhöhung von Proteinen.....	129
4.17	Größenausschluss-Chromatographie (SEC) mithilfe eines ÄKTA-Systems.....	129
4.18	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	130
4.19	Western-Blot und Immundetektion von Proteinen mit Affinitätsmarker	131
4.19.1	Semi-Dry Blot	132
4.19.2	Blockieren der Nitrocellulose-Membran.....	132
4.19.3	Immundetektion der Proteine	132
4.19.4	Farbreaktion	133
4.20	Rekonstitution isolierter BioM ₂ NY-Komplexe.....	133
4.21	Messung der ATPase-Aktivität nach Ames	134
4.21.1	Enzymreaktion	135
4.21.2	Nachweis von anorganischem Phosphat	135
4.22	Chemische Quervernetzung von Thiolgruppen	136
4.22.1	Quervernetzung von BioM ₂ NY durch Kupferphenantrolin in isolierten Membranen.....	136
4.22.2	Längenspezifische Quervernetzung isolierter BioM ₂ NY-Komplexe.....	136
4.23	Fluoreszenzspektroskopie	137
4.23.1	Fluoreszenzmarkierung von Thiolgruppen mit MIANS	138
4.23.2	Aufnahme von Fluoreszenzspektren	138
4.24	Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie	138
4.24.1	Grundlagen der ESR-Spektroskopie	138
4.24.2	Spinmarkierung von Proteinen mit MTSSL.....	140
4.24.3	<i>Continuous-Wave</i> (cw)-ESR-Spektroskopie	140

4.24.4 Gepulste ESR-Spektroskopie (DEER)	141
4.25 Detektion von proteingebundenem Biotin mittel LC/MS-TOF	142
4.26 Nachweis radioaktiv markierter Substrate mittels Flüssigkeitsszintillation	143
4.26.1 Detektion von zellassoziertem [^3H]Biotin	143
4.26.2 Detektion von zellassoziertem $^{57}\text{Co}^{2+}$	144
4.26.3 Detektion von proteingebundenem [^3H]Biotin	144
Literaturverzeichnis.....	146
Anhang	162
Danksagung.....	166
Eidesstattliche Erklärung.....	167

Abkürzungsverzeichnis

A	ATPase
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ApoA1	Apolipoprotein A1
ATP	Adenosintriphosphat
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
Ap	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BCCP	<i>biotin carboxyl carrier protein</i>
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
BPL	Biotin-Protein-Ligase
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis conductance regulator</i>
CH	Kopplungshelix
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
cpm	<i>counts per minute</i>
Cu-Phe	Kupferphenantrolin
cw	<i>continuous wave</i>
Cys-less	cysteinfrei
Da	Dalton
DAPA	7,8-Diaminopelargonsäure (auch 7,8-Diaminononanoat)
DEER	<i>double electron-electron resonance</i>
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

dpm	<i>disintegrations per minute</i>
DTT	Dithiothreitol
EBS	1,2-Ethandiyl-Bis-Methanthiosulfonat
ECF	<i>Energy-Coupling Factor</i>
EcfA	ATPase eines ECF-Transporters
EcfT	T-Komponente eines ECF-Transporters
EcfS	S-Komponente eines ECF-Transporters
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIIA	Enzym IIA
ESI-TOF	<i>electrospray ionisation time-of-flight</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
Flp	Flippase
for	<i>forward</i>
FRT	<i>Flp recognition target</i>
GN	glukosehaltiges Mineralmedium
x g	x Erdbeschleunigung
H₂O_{dd}	doppelt-destilliertes Wasser
HBS	1,6-Hexandiyl-Bis-Methanthiosulfonat
His-Tag	Deca-Histidin-Tag
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
KAPA	7-Keto-8-aminopelargonsäure (auch 8-Amino-7-oxononanoat)
Km	Kanamycin
LacI	Inhibitor des Lac-Operons
LC/MS-TOF	Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte <i>time-of-flight</i> -Massenspektrometrie
LB	<i>lysogeny broth</i>
MIANS	2-(4'-Maleimidylanilino)-Naphthalen-6-Sulfonsäure
2-ME	2-Mercaptoethanol
MCT	Monocarboxylattransporter
MDR1	<i>multidrug resistance protein</i>
MSP	Gürtelprotein (<i>membrane scaffold protein</i>)
MTSSL	Methanthiosulfonat-Spinlabel
N-	Amino-
NBD	Nukleotidbindedomäne
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NEB	New England Biolabs
NEM	N-Ethylmaleimid

NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
P_i	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecan-1,17-diyl-Bis-Methanthiosulfonat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
P-gp	P-Glykoprotein
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PTS	Phosphotransferasesystem
rev	<i>reverse</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Substratspezifische Komponente eines ECF-Transporters
SBP	Substratbindeprotein (<i>soluble binding protein</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SMVT	Natriumabhängiger Multivitamintransporter
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	SOC mit Glukose
T	Transmembrankomponente eines ECF-Transporters
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TMH	Transmembranelix
TRAP	<i>tryptophan attenuator protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polysorbat 20
UV	Ultraviolett

Englische Begriffe wurden in der gesamten Arbeit kursiv gedruckt. Zur Bezeichnung von Aminosäuren wurden Ein- und Dreibuchstabencode verwendet.

1. Einleitung

1.1 Transport über biologische Membranen

Der Transport von Molekülen über biologische Membranen gehört zu den wichtigsten und kritischsten Prozessen des Lebens. Membranen stellen nicht nur eine zu überwindende Barriere dar, sie sind durch ihre Funktion bei der Kompartimentierung und Abgrenzung des Zellinneren von der Umgebung zugleich ursächliche Voraussetzung für das Leben, indem sie energetische Potentiale und Stoffgradienten ermöglichen und damit die Grundlage der molekularen Organisation des Lebens schaffen. Aufgrund ihrer hydrophoben Zusammensetzung sind Membranen für die meisten in Wasser gelösten Substanzen undurchlässig und ihre Passage erfordert deshalb viele hochspezifische Transportsysteme. Etwa 10 % des Genoms von *Escherichia coli* codieren lösliche oder membranständige Proteine, die in Transportprozesse involviert sind (Blattner et al., 1997). Transportprozesse werden nach der Herkunft der Energie eingeteilt, die die Translokation eines Substrates über die Membran antreibt (*Transporter Classification Database* [www.tcdb.org]). Beim passiven Transport diffundieren Substrate entlang ihres Konzentrationsgefälles und damit entropiegetrieben durch Kanäle oder Porine. Aktive Transporter nutzen dagegen von außen zugeführte Energie, und Moleküle oder Ionen können so quantitativ entgegen ihres chemischen Potentials über die Membran befördert werden (Saier et al., 2016). Bei primär aktiven Transportern stammt diese Energie häufig aus chemischen Reaktionen wie der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP). Diese Energiequelle wird von verschiedenen Transportsystemen in über 20 Superfamilien genutzt, zu denen auch die ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter gehören (Saier et al., 2016).

1.2 ABC-Transporter

1.2.1 Verbreitung und Bedeutung von ABC-Transportern

ABC-Transporter sind in allen Domänen des Lebens weit verbreitet und stellen eine der größten Proteinsuperfamilien dar (Theodoulou und Kerr, 2015). Während Exporter sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten vorkommen, sind Importer bis auf wenige, kürzlich entdeckte Ausnahmen auf Bakterien und Archaeen beschränkt (Eitinger et al., 2011). Die Entdeckung der ABC-Transporter liegt etwa 40 Jahre zurück und beruhte auf der Beobachtung

ATP-abhängiger Importsysteme für Zucker bei gramnegativen Bakterien, die offenbar von einer löslichen extrazellulären Komponente abhingen (Berger und Heppel, 1974). Wie sich später herausstellte, sind diese löslichen Substratbindepoteine ein Schlüsselmerkmal der ABC-Importer von Bakterien. Die Identifizierung und Sequenzierung weiterer ATP-hydrolysierender bakterieller Importer (Gilson et al., 1982; Higgins et al., 1982) und des humanen P-Glykoproteins (P-gp) (Riordan et al., 1985) offenbarten in den 1980er Jahren schließlich eine übergeordnete Organisation und die weitreichende Bedeutung dieser Systeme, die letztlich zur Begründung der ABC-Superfamilie und Prägung des Begriffes „*ATP-binding cassette* (ABC)“ führte (Hyde et al., 1990). Die namensgebende ATP-Bindekassette besteht aus zwei Nukleotidbindedomänen (NBDs), die über streng konservierte Struktur motive ATP binden und hydrolysieren und damit den Substrattransport antreiben (Rice et al., 2014; Walker et al., 1982).

Das menschliche Genom codiert für 49 ausschließlich exportierende ABC-Transporter. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, ein einzelliger Eukaryot, besitzt sogar 56 ABC-Transporter. Pflanzengenome codieren häufig für über 100 verschiedene Systeme und in *Arabidopsis thaliana* wurden sogar über 120 ABC-Transporter entdeckt (Kang, 2011). *E. coli* K-12 weist 57 ABC-Transporter auf, die von etwa 5% des 4,6 Megabasen großen Genoms kodiert werden (Linton und Higgins, 1998). Da bei Bakterien und Archaeen durchschnittlich etwa 1-3 % aller Gene mit ABC-Transportern assoziiert sind, besitzen sie im Vergleich mit anderen Organismen bezogen auf ihre Genomgröße die meisten ABC-Transporter (Davidson et al., 2008; Tomii und Kanehisa, 1998). Die weitreichende Palette ihrer Substrate, die von Spurenelementen und Ionen über Mono- und Polysaccharide bis hin zu Vitaminen, Aminosäuren, ganzen Peptiden und Lipiden reicht, verdeutlicht die Signifikanz dieser Systeme. Ihre Aufgaben reichen demnach vom Nährstoff- oder Vitaminimport bis zum Export von Metaboliten, Lipiden, Zelltoxinen oder Pathogenitätsfaktoren, und beim Menschen sind Fehlfunktionen mit schwerwiegenden Krankheiten assoziiert (Theodoulou und Kerr, 2015). So kann bereits eine einzelne Mutation des humanen ATP-abhängigen Chlorid-Kanals CFTR zu einer fehlerhaften Osmoregulation führen, die für die zystische Fibrose verantwortlich ist (Bose et al., 2015). Die Sekretion von Phospholipiden und Cholesterol in das humane Apolipoprotein A1 (apoA1) zur Bildung von *high density lipoprotein* (HDL) wird durch den ABC-Transporter ABCA1 vermittelt und Defekte sind mit Arteriosklerose und der Tangier-Krankheit assoziiert (Soumian et al., 2005). Fehlfunktionen anderer ABC-Transporter stehen mit Alzheimer (Li et al., 2015), Makuladegeneration (Westerfeld und Mukai, 2008), Adrenoleukodystrophie (Hlavac und Soucek, 2015) oder Diabetes im Zusammenhang (de Wet und Proks, 2015). Umgekehrt

führt die Überproduktion des humanen P-Glykoproteins *multidrug resistance protein* (MDR1) oder des *breast cancer resistance protein* (BCRP) in Tumorzellen zu einem quantitativen Export diverser Zelltoxine und damit zu einer Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen (Callaghan, 2015; Doyle et al., 1996; Gottesman und Pastan, 1993). Der bakterielle ABC-Transporter LmrA ist ein Homolog des humanen P-Glykoproteins, das gleichermaßen Antibiotika aus der Zelle transportiert und dadurch zur multiplen Antibiotikaresistenz beiträgt (van Veen et al., 1998).

1.2.2 Klassifizierung und grundlegender Aufbau von ABC-Transportern

Die Superfamilie der ABC-Transporter gehört zu den ABC-Systemen, die etwa 600 Mitglieder in 29 Familien zählen (Dassa und Bouige, 2001). Eine phylogenetische Analyse aller bekannter Proteine führte zu einer Aufteilung in drei Klassen, die mit der funktionellen Gliederung in Exporter (Klasse I), Importer (Klasse III) und einer weiteren Gruppe von nicht transportierenden ABC-Systemen (Klasse II) weitgehend übereinstimmt (Davidson et al., 2008). Zur Klasse II gehören Proteine, die in Zellteilungs- oder pflanzliche Nodulationsprozesse involviert sind (Higgins et al., 1986) sowie das weit verbreitete Doppelstrangbruch-Reparatursystem Rad50/Mre11 (Hopfner et al., 2000). Letzteres hat maßgeblich zum Verständnis der Funktion von ABC-Systemen beigetragen. Die vorrangig bei Eukaryoten vorkommenden Exporter werden in sieben Familien (ABC A-G) und die bakteriellen Importer in zwei Gruppen gegliedert (Rice et al., 2014). Die erst seit wenigen Jahren bekannten ECF-Transporter werden in jüngerer Zeit häufig als Importer der Gruppe III bezeichnet (Rice et al., 2014). Aufgrund signifikanter struktureller und mechanistischer Unterschiede zwischen ECF-Transportern und klassischen ABC-Importern (Gruppe I und II) werden letztere auch häufig als kanonische ABC-Importeure bezeichnet (Eitinger et al., 2011).

Mit Ausnahme der ECF-Transporter weisen alle ABC-Transporter eine grundlegend vergleichbare Zusammensetzung auf, die auf einen sehr frühen evolutionären Ursprung hinweist (Davidson et al., 2008). Im Kern bestehen sie aus zwei Transmembrandomänen (TMD), die eine Translokationspore für das Substrat bilden, und zwei ATPasen auf der zytoplasmatischen Seite, die häufig auch als Nukleotidbindedomänen (NBD) bezeichnet werden (Abb. 1). Bei Exportern sind TMDs und NBDs häufig zu Halbtransportern fusioniert, die als Dimer den Holotransporter bilden. Eukaryotische Exporter liegen meist sogar in Form einer einzigen Polypeptidkette vor, die alle vier Domänen enthält (Davidson et al., 2008). Einer der am besten untersuchten Exporter ist Sav1866 aus *Staphylococcus aureus*, ein Homolog der

P-Glykoproteine LmrA aus *L. lactis* und des humanen MDR1, das aus zwei Halbtransportern zusammengesetzt ist (Dawson und Locher, 2006). Bei prokaryotischen Importern stellen die Domänen in der Regel einzelne Proteine dar, die als Hetero- oder Homodimere vorliegen (Eitinger et al., 2011). Kanonische Importer besitzen zusätzlich eine extrazelluläre Komponente, die für die hoch-affine und spezifische Bindung des Substrates zuständig ist und dieses an die TMDs weiterreicht. Diese Substratbindepoteine (*solute binding proteins*, SBP) sind im Periplasma gramnegativer Bakterien frei beweglich und bei grampositiven Bakterien und Archaeen über N-terminale Lipidanker oder eine N-terminale hydrophobe Helix in der Membran fixiert (Sutcliffe und Russell, 1995). Es gibt aber auch SBPs, die mit den TMDs kovalent fusioniert sind und so Transporter mit mehreren Substratbindestellen bilden können (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). ECF-Transporter besitzen neben den ATPasen zwei nicht-homologe Membranproteine, von denen eins mit beiden ATPasen interagiert (T) und das andere für die Substratbindung verantwortlich ist (S).

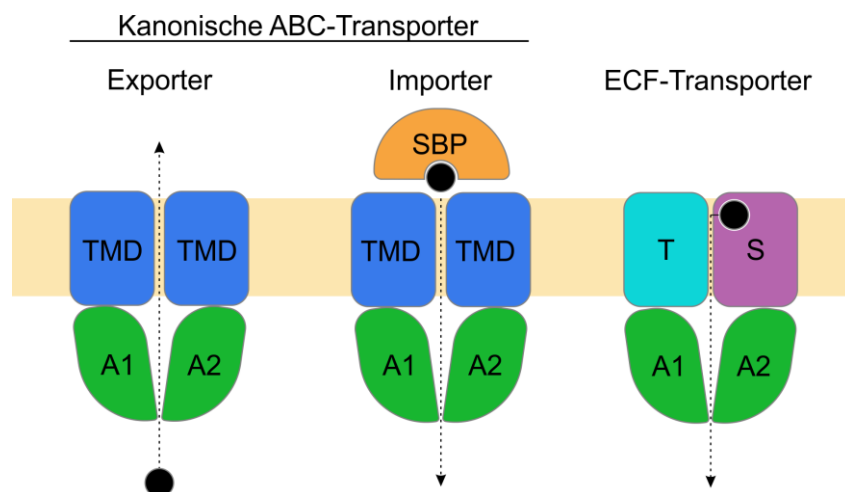


Abb. 1: Schematische Darstellung von ABC-Transportern. Kanonische ABC-Transporter bestehen aus zwei symmetrischen oder pseudosymmetrischen Halbtransportern, die aus einer Transmembrandomäne (TMD) und einer ATPase (A, auch NBD genannt) zusammengesetzt sind. Bei prokaryotischen Importern liegen diese als separate Proteine vor, die bei Exportern dagegen in den meisten Fällen zu Polypeptidketten fusioniert sind. Importer benötigen zusätzlich hochspezifische, extrazelluläre Substratbindepoteine (SBP), die frei beweglich oder an den TMDs oder in der Membran verankert sein können. ECF-Transporter sind Importer ohne SBP. Die Substratspezifität wird hier durch ein membranständiges Protein (S) gegeben, welches mit einem Energetisierungsmodul (A1A2T) interagiert, das aus einer weiteren membranständigen Komponente (T) und einem ATPase-Dimer (A1 und A2) besteht.

1.2.3 Struktur kanonischer ABC-Importer

Die Gemeinsamkeit von kanonischen ABC-Transportern und ECF-Transportern sind die ATPasen, die in ihren funktionellen Regionen stark konserviert sind und stets eine konservierte katalytische Domäne und eine deutlich variabelere Region, die sogenannte helikale Domäne, enthalten (Davidson und Maloney, 2007; Rodionov et al., 2009). Die katalytische Domäne weist eine starke Ähnlichkeit zu Proteinen der RecA-Superfamilie auf, deren Mitglieder in allen Organismen vorkommen und in DNA-Reparaturprozesse, homologe Rekombination und die Induktion des bakteriellen SOS-Systems, einer physiologischen Antwort auf Stresssituationen, involviert sind (McGrew und Knight, 2006; Selbitschka et al., 1991; Story et al., 1993). Diese Domäne enthält die Walker A- und Walker B- Motive, die ursprünglich bei der F1-ATPase entdeckt wurden (Walker et al., 1982) sowie eine als *Switch*-Region bezeichnete Schleife mit einem konservierten Histidinrest. Die helikale Domäne trägt das LSGGQ-Motiv, das ausschließlich in ABC-ATPasen vorkommt und deshalb die Bezeichnung des Signaturmotivs trägt (Linton und Higgins, 1998). Die helikale Domäne ist außerdem der Teil der ATPasen, über den die hauptsächliche Kopplung mit den TMDs erfolgt (Mourez et al., 1997). Die strukturellen Grundlagen der ATP-Hydrolyse sind heute durch biochemische Untersuchungen und Kristallstrukturanalysen einzelner oder dimerer ATPasen und ganzer ABC-Transporter weitgehend bekannt. Maßgeblich beigetragen haben Strukturen von HisP, der NBD der Histidin-Permease aus *Salmonella Typhimurium* (Hung et al., 1998), der Rad50-ATPase aus *Pyrococcus furiosus* (Hopfner et al., 2000), des ATPase-Dimers HlyB₂ des Typ I-Sekretionssystems (Zaitseva et al., 2005) und des MalK-Dimers aus *E. coli* (Chen et al., 2003; Oldham und Chen, 2011). So bilden alle ABC-ATPasen funktionelle Dimere aus, in denen die NBDs in einer sogenannten *Head-to-Tail*- oder „Kopf-an-Schwanz“-Orientierung liegen und die sandwichartig um zwei ATP-Moleküle schließen. An der Bindung eines Nukleotids sind dabei Struktur motive aus beiden NBDs bzw. ATPasen beteiligt (Davidson und Chen, 2004). Das Walker A-Motiv (auch *P-Loop* genannt) ist durch die Sequenz GxxGxGK(S/T) (x steht für jede beliebige Aminosäure) charakterisiert und bildet über die ϵ -Aminogruppe seines streng konservierten Lysinrestes zusammen mit Stickstoffatomen der Amide des Peptidrückgrats ein Wasserstoffbrückennetz mit der β - und γ -Phosphatgruppe des ATP aus. Das γ -Phosphat wird gleichzeitig durch das Signaturmotiv der anderen ATPase-Untereinheit und das Histidin der *Switch*-Region (*H-Loop*) stabilisiert. Das Walker B-Motiv mit der Konsensussequenz $\phi\phi\phi\phi D$ (ϕ steht für eine hydrophobe Aminosäure) verläuft als Beta-Strang durch den Kern des aktiven Zentrums und koordiniert über sein konserviertes Aspartat das für die ATP-Hydrolyse

essentielle Mg^{2+} -Ion. Unmittelbar hinter diesem Aspartat folgt ein in ABC-ATPasen konservierter Glutamatrest, der den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls auf die β - γ -Phosphodiester-Bindung initiiert und daher als katalytisches Carboxylat oder katalytische Base der Hydrolyse bezeichnet wird (Moody et al., 2002; Orelle et al., 2003). Anhand des *Multidrug Resistance Proteins* BmrA aus *Bacillus subtilis* wurde gezeigt, dass Austausch dieses Glutamatrestes die Hydrolyse blockieren, aber keinen Einfluss auf die Bindung von ATP haben (Orelle et al., 2003). Das Histidin des H-Loops ist neben der Koordination des γ -Phosphates an der Positionierung sowohl dieses katalytischen Carboxylats als auch des sogenannten D-Loops beteiligt, welcher wiederum eine zentrale Rolle in der allosterischen Interaktion (*cross-talk*) der beiden ATPase-Untereinheiten spielt (De la Rosa und Nelson, 2011; Jones und George, 2012). Sowohl der Histidinrest als auch das Glutamat hinter dem Walker B-Motiv sind für die Hydrolyse unerlässlich und tragen daher die Bezeichnung „Katalytische Dyade“ (Zaitseva et al., 2005). Ein letztes konserviertes Motiv der ABC-ATPasen stellt der sogenannte Q-Loop dar, der zwischen der katalytischen und der helikalen Domäne liegt und in die Interaktion der NBD mit dem sogenannten EAA-Loop der TMD involviert ist (Locher et al., 2002).

Die Transmembrandomänen der ABC-Transporter sind verglichen mit den Nukleotidbindedomänen sehr gering konserviert. Auf der Basis ihrer Diversität lässt sich eine Unterteilung der kanonischen Importer in zwei Gruppen vornehmen (Locher, 2009; Rice et al., 2014). Grundsätzlich besitzen Importer der Gruppe I weniger Transmembranhelices, die von 4 bis 8 pro TMD reichen können und sehr divers organisiert sind. Der Methionintransporter MetNI aus *E. coli* besteht beispielsweise aus zwei homodimeren TMDs, die mit je 5 Membranhelices einen Kern aus insgesamt 10 Helices ergeben (Kadaba et al., 2008). Die ebenfalls homodimeren TMDs des Molybdätransporters ModBC aus *Archaeoglobus fulgidus* besitzen je eine weitere Membranhelix (Hollenstein et al., 2007). Der Maltose-/Maltodextrintransporter MalFGK aus *E. coli* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, der durch Kristallstrukturen in unterschiedlichen Zuständen zu den am besten charakterisierten ABC-Transportern überhaupt gehört, ist dagegen aus zwei separat codierten TMDs aus je 6 und 8 Membranhelices zusammengesetzt (Khare et al., 2009; Oldham und Chen, 2011; Oldham et al., 2007). Trotz dieser variablen Organisation weisen die Mitglieder der Gruppe I einen einheitlichen Mechanismus auf, der strukturelle Reorientierungen von stets 4 Helices im Kern der TMDs beinhaltet (Rice et al., 2014). Importer der Gruppe II besitzen ausschließlich homodimere TMDs, die aus je 10 Membranhelices bestehen und damit deutlich größer und einheitlicher zusammengesetzt sind als Vertreter der Gruppe I (ter Beek et al., 2014). Zu den

am besten untersuchten Importern gehört hier der Vitamin B12-Transporter BtuC₂D₂ aus *E. coli*, von dem Kristallstrukturen im Nukleotid- sowie SBP-freien und -gebundenen Zustand vorliegen (Borths et al., 2002; Hvorup et al., 2007; Korkhov et al., 2012; Locher et al., 2002). Distinkte strukturelle und strukturdynamische Daten dieses Transporters deuten vermehrt auf mechanistische Unterschiede zwischen den Importern der beiden Gruppen hin, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird (Korkhov et al., 2012; Lewinson et al., 2010). Das *Alternating Access*-Modell beschreibt jedoch einen im Grundsatz für alle kanonischen ABC-Transporter gültigen Mechanismus, der durch den ATP-abhängigen Wechsel einer nach außen und nach innen geöffneten Konformation des TMD-Kerns charakterisiert ist. Bei der konformationellen Kopplung zwischen den Komponenten spielen die Kopplungshelices in den TMDs eine Rolle, die sowohl in Exportern als auch Importern existieren (Dawson et al., 2007). Die Kopplungshelices kanonischer ABC-Importer enthalten einen sogenannten *EAA-Loop*, der aus 20 Aminosäuren mit der Konsensussequenz EAAx₃Gx₉IxLP besteht (x steht für jede beliebige Aminosäure) und mit der helikalen Domäne einer ATPase interagiert (Daus et al., 2007; Mourez et al., 1997). Auf der extrazellulären Seite besitzen die TMDs Schleifenregionen, die bei kanonischen Importern mit den löslichen Substratbindeteinen (SBP) interagieren. Diese SBPs sind hochspezifisch und binden ihre Substrate, die von Ionen über Zucker bis hin zu Vitaminen oder Peptiden reichen, mit hoher Affinität. Dissoziationskonstanten im Bereich von 0,01 μ M bis 1 μ M wurden beschrieben (Eitinger et al., 2011). Trotz geringer Sequenzidentität weisen alle SBPs eine einheitliche Faltung auf, die durch zwei globuläre Domänen (je nach entsprechendem Proteinterminus N- oder C-Flügel) und eine verbindende (*Hinge*-) Region charakterisiert ist (Quiocho und Ledvina, 1996). In der Mulde zwischen den beiden Flügeln befindet sich die Substratbindestelle. Neben der Bindung und Bereitstellung der Substrate haben diese SBPs eine Schlüsselfunktion in der Auslösung des Transportzyklus inne (Shilton, 2008).

Eine Besonderheit der ABC-Importer der Gruppe I stellen regulatorische Komponenten dar, die bei einigen Vertretern bekannt sind und eine substratabhängige Inhibierung der ATP-Hydrolyse bewirken (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). So interagiert beispielsweise das vom PTS stammende Enzym IIA (EIIA^{Glc}) in unphosphorylierter Form, die bei Anwesenheit von Glukose vorliegt, mit den NBDs (MalK) von MalFGK₂ und verhindert damit ein Schließen des ATPase-Dimers und so eine weitere Aufnahme von Maltose (Chen et al., 2013; Wuttge et al., 2016). Bei ModBC aus *Methanosarcina acetivorans* und MetNI sind direkte Interaktionen des Substrates mit dem C-terminalen Bereich der NBDs bekannt, die zu einer Inhibierung der Aktivität führen

(Gerber et al., 2008; Kadaba et al., 2008). Die strukturellen Schlüsselmerkmale der kanonischen ABC-Importer und ATPasen sind in Abb. 2 am Beispiel des Vitamin B₁₂-Transporters BtuC₂D₂ und des Maltosetransporters MalFGK₂-E hervorgehoben.

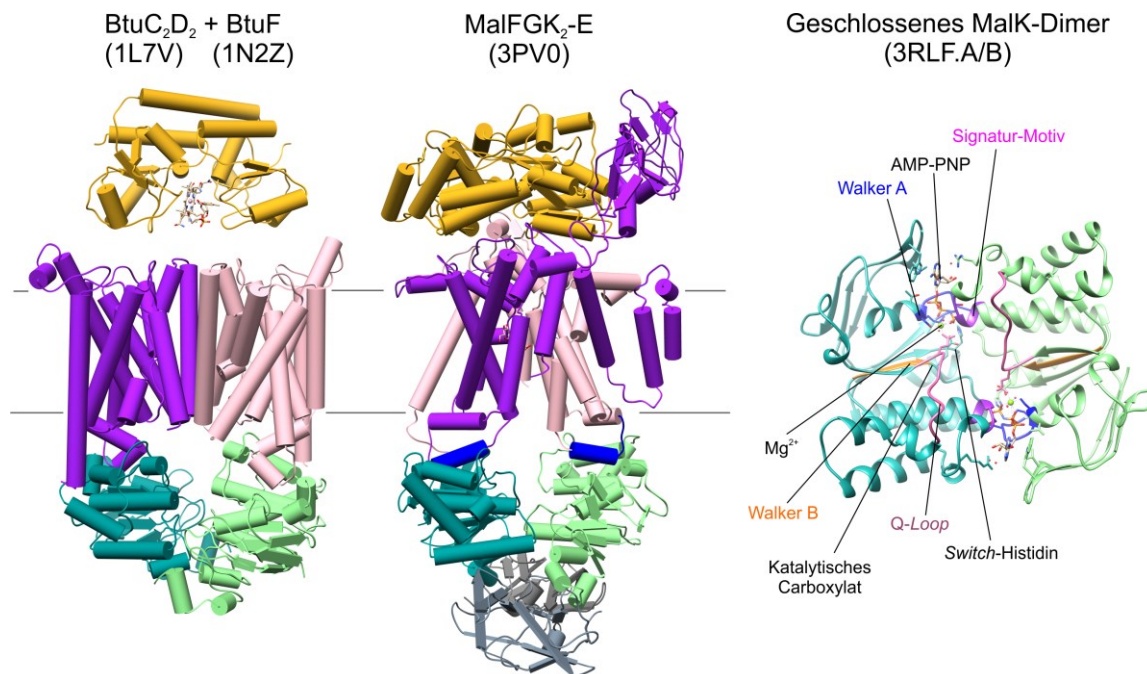


Abb. 2: Strukturvergleich kanonischer ABC-Importer der Gruppe I und II. Zur Gegenüberstellung der strukturellen Unterschiede kanonischer ABC-Importer der Gruppen I und II sind Kristallstrukturen des Vitamin B₁₂-Transporters BtuC₂D₂ (Gruppe II) aus *E. coli* (Locher et al., 2002) und des Maltosetransporters MalFGK₂-E (Gruppe I) aus *E. coli*/*Salmonella* serovar Typhimurium (im sogenannten *pre-translocation state*) (Oldham und Chen, 2011) dargestellt. Die TMDs sind lila (BtuC/MalF) und pink (BtuC'/MalG), die NBDs dunkelgrün (BtuD/MalK) bzw. hellgrün (BtuD'/MalK') und die SBPs (BtuF/MalE) gelb eingefärbt. BtuF (Borths et al., 2002) wurde ohne BtuCD kristallisiert und lediglich zur Veranschaulichung des Komplexes hinzugefügt. MalE steht hauptsächlich über den P2-Loop, einer extrazellulären globulären Extension von MalF, mit den TMDs im Kontakt. Die blau markierte Region in MalF/G kennzeichnet den Bereich des EAA-Loops, der mit der jeweiligen helikalen Domäne der NBD und dem Q-Loop interagiert. Die C-terminalen Bereiche von MalK sind regulatorische Domänen und grau dargestellt. Das MalK-Dimer rechts im Bild repräsentiert den nukleotidgebundenen und geschlossenen Zustand und wurde mit AMP-PNP kristallisiert (Oldham und Chen, 2011). Die Perspektive von oben verdeutlicht, wie das Walker A-Motiv der einen und das Signaturmotiv der anderen Untereinheit jeweils an der Bindung der Nukleotide beteiligt sind und so zu einem sandwichartigen Schließen beider NBDs um die Nukleotide führen. Die Abbildung wurde unter Nutzung der oben stehenden pdb-Codes mit der Modellierungssoftware SWISS MODEL (Biasini et al., 2014) erstellt.

1.2.4 Transportmechanismus kanonischer ABC-Importer

Das heutige Wissen über die Funktionsweise von ABC-Transportern basiert auf einer Vielzahl biochemischer und biophysikalischer Analysen, mathematischer Modellierungen und nicht zuletzt Kristallstrukturanalysen unterschiedlicher ABC-Transporter. Kristallstrukturen gleichen Momentaufnahmen, die einzigartige Einblicke in einzelne Stadien des Transportzyklus gewähren und damit Hinweise auf die Funktionsweise von ABC-Transportern geben können. Der Vitamin B₁₂-Transporter BtuC₂D₂ (Hvorup et al., 2007; Korkhov et al., 2012; Locher et al., 2002) und der Maltosetransporter MalFGK₂-E (Khare et al., 2009; Oldham und Chen, 2011; Oldham et al., 2007) aus *E. coli* sind die einzigen ABC-Importer, die bisher im ATP-freien und im nukleotidgebundenen Zustand (mit ATP oder AMP-PNP, einem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogon) kristallisiert wurden. Über den Vergleich der verschiedenen Kristallstrukturen von MalFGK₂-E konnten in Kombination mit biophysikalischen Methoden (Austermuhle et al., 2004; Grote et al., 2008; Grote et al., 2009; Orelle et al., 2008) und Modellierungen (Hsu et al., 2016) detaillierte Einblicke in die Funktion wie bei keinem anderen ABC-Transporter gewonnen werden, von denen sich ein Mechanismus nach dem sogenannten *Alternating Access*-Modell ableiten ließ (Oldham et al., 2008). Dieser Mechanismus ist durch eine wechselseitig nach innen und nach außen geöffnete Pore charakterisiert und wurde bereits in den 1960er Jahren in Abgrenzung zur *Carrier*-Hypothese, die Bewegungen ganzer Proteine oder Domänen innerhalb der Membran enthielt, als allgemeines Modell für Membrantransporter vorgeschlagen (Jardetzky, 1966). Anhand des Maltosetransporters lässt sich ein sehr detailliertes Bild des Transportzyklus beschreiben. Im ATP-freien (Apo-) Zustand ist die Öffnung des Transportkanals, der durch die beiden TMDs MalF und MalG gebildet wird, zum Zytoplasma gerichtet und das NBD-Dimer ist geöffnet (Khare et al., 2009). Wie eine Kristallstruktur eines ATP-gebundenen MalFGK₂-Komplexes zeigte, reicht die alleinige Bindung von ATP jedoch nicht aus, um das NBD-Dimer vollständig zu schließen (Oldham et al., 2007). In diesem Zustand werden die ATP-Moleküle lediglich von den Walker-A-Motiven koordiniert und die Translokationspore ist weiterhin zur Seite des Zytoplasmas geöffnet. Eine Kristallstruktur, in der MalFGK₂ im Komplex mit seinem substratbeladenen SBP (MalE) vorliegt, hatte zu dem Vorschlag geführt, dass das SBP an den ATP-freien Transporter bindet und eine Annäherung der NBDs bewirkt, die der ATP-Bindung vorausgeht und dass dieser Zustand das Ausgangsstadium für den Transportzyklus darstellen könnte (Oldham und Chen, 2011). Da die intrazelluläre ATP-Konzentration den K_m-Wert des Maltosetransporters um eine Größenordnung übersteigt (Davidson et al., 1992), ist es allerdings wahrscheinlicher, dass der

ATP-gebundene Komplex den sogenannten Ruhe-Zustand (*Resting State*) repräsentiert (Oldham et al., 2008). Kristallstrukturen und experimentell ermittelte Abstände zwischen den NBDs haben allerdings klar gezeigt, dass erst die gemeinsame Wirkung von beladenem SBP und ATP ein stabiles Schließen des NBD-Dimers ermöglicht und die Öffnung der Transportpore nach außen herbeiführen kann (Böhm et al., 2013; Oldham und Chen, 2011; Orelle et al., 2008). Durch das vollständige Schließen des NBD-Dimers wird ein Teil der TMDs in der Membran gedreht, die Translokationspore öffnet sich zur extrazellulären Seite und das SBP wird in eine offene Konformation gestreckt (Austermuhle et al., 2004; Oldham et al., 2007), die es einer Substratbindestelle in der Translokationspore ermöglicht, das Substrat vom SBP zu übernehmen (Oldham et al., 2013). Durch Hydrolyse von ATP und Dissoziation von ADP und anorganischem Phosphat kehrt der Komplex in seinen Ausgangszustand zurück, sodass die Pore zum Zytoplasma hin geöffnet wird und das Substrat in die Zelle entweichen kann (Rice et al., 2014). Strukturen anderer ABC-Importer deuten auf eine Allgemeingültigkeit dieses Mechanismus hin (Hollenstein et al., 2007; Kadaba et al., 2008), obwohl für den Vitamin B₁₂-Transporter BtuC₂D₂ und andere große ABC-Importer Abweichungen von diesem Modell vorgeschlagen wurden (Hvorup et al., 2007; Lewinson et al., 2010). Aktivitätsmessungen an isolierten MalFGK₂ oder HisQMP₂, der Histidinpermease aus *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, hatten gezeigt, dass erst durch Bindung von beladenem SBP an den Komplex eine Stimulation der ATP-Hydrolyse erfolgt und ATP somit erst verbraucht wird, wenn Substrat für die Translokation verfügbar ist (Ames et al., 2001; Davidson et al., 1992).

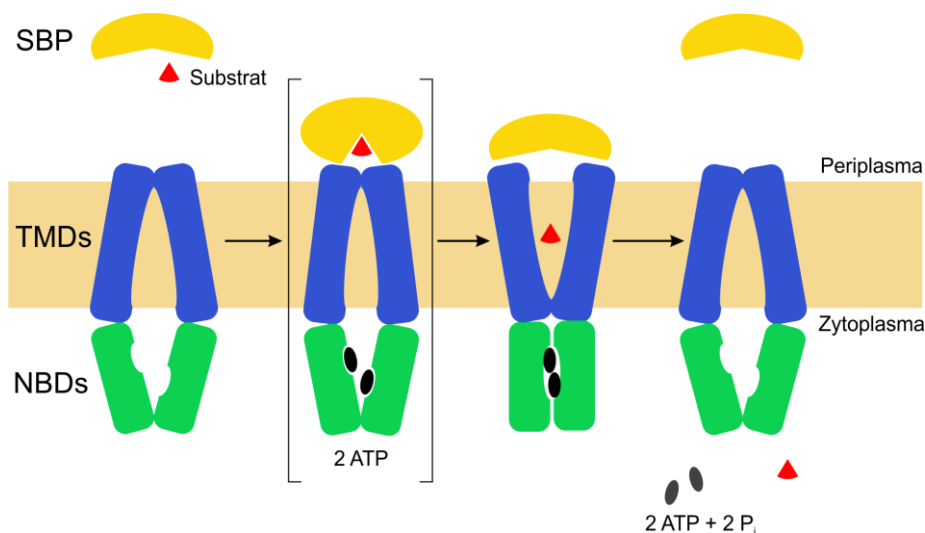


Abb. 3: Schematische Darstellung des *Alternating Access-Modells* kanonischer ABC-Importer. Im Ruhezustand ist der Transporter nach innen geöffnet. Aufgrund der hohen ATP-Konzentration in der Zelle ist ein ATP-gebundener Ruhezustand wahrscheinlich. Die alleinige Bindung von ATP an die Nukleotidbindedomänen (NBDs) genügt jedoch nicht, um das Dimer vollends zu schließen. Erst bei Anwesenheit von beladenem Substratbindeprotein (SBP) werden die NBDs in einen halb-geschlossenen Zustand überführt, in dem ATP stabil binden kann. Dieser Zustand ist mit Klammern eingefasst, da die Reihenfolge der Bindung von ATP und SBP nicht klar ist. Durch vollständiges Schließen des NBD-Dimers wird die Pore zwischen den Transmembrandomänen (TMDs) nach außen hin geöffnet und das SPB erfährt eine Streckung, die es dem Substrat erlaubt, in den Transportkanal zu entweichen. Durch ATP-Hydrolyse und Dissoziation von ADP und P_i kehrt der Komplex in den Ausgangszustand zurück und entlässt das Substrat ins Zytosol (Rice et al., 2014).

1.3 ECF-Transporter

ECF-Transporter sind eine Unterfamilie der ABC-Importer, die erst vor wenigen Jahren als solche erkannt und benannt wurden und sich sowohl strukturell als auch mechanistisch grundlegend von den bisher beschriebenen kanonischen ABC-Importern unterscheiden (Eitinger et al., 2011; Slotboom, 2014; Zhang, 2013). Anders als diese bestehen ECF-Transporter aus einem konservierten Membranprotein (T), das mit einem Dimer aus ATPasen (A1, A2) interagiert, und einem substratspezifischen Protein (S), welches im Gegensatz zu den löslichen SBPs kanonischer ABC-Importer gänzlich in der Membran lokalisiert ist (Abb. 1) (Rodionov et al., 2009). Die ATPasen und die T-Komponente bilden gemeinsam das A1A2T- oder Energetisierungsmodul. Der namensgebende Term *energy-coupling factor* (ECF) wurde bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts geprägt und geht zurück auf die Beobachtung eines damals unbekannten Mechanismus des Vitamintransports bei *Lactobacillus casei*, der von einem nicht identifizierten Energetisierungsmodul und um dieses kompetitierenden, für Folat, Biotin und Thiamin spezifischen Membranproteinen abzuhängen schien (Henderson et al., 1979).

Fast dreißig Jahre später wurde mit der Entdeckung und dem experimentellen Nachweis der Kobalt- und Nickeltransporter CbiMNQO und NikMNQO (Rodionov et al., 2006) sowie des Biotintransporters BioM₂NY aus dem Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus* (Hebbeln et al., 2007) die Tür zu den molekularen Grundlagen dieser ursprünglichen Beobachtung aufgestoßen. In einer umfassenden vergleichenden Analyse von über 300 bakteriellen und archeellen Genomen wurden schließlich weit über 400 ECF-Transporter entdeckt, die zur Begründung einer neuen Transporterfamilie führten (Rodionov et al., 2009). Etliche

humanpathogene Stämme wie *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma genitalium* oder *Listeria monocytogenes* hängen von der Vitaminaufnahme durch ECF-Transporter ab, weshalb diese Systeme eine offensichtliche klinische Relevanz besitzen (Rodionov et al., 2009; Schauer et al., 2009).

1.3.1 Klassifizierung von ECF-Transportern

Anhand der Organisation der für ECF-Transporter codierenden Gene lassen sich diese in zwei Subklassen unterteilen. Die Gene der S-Komponenten sind entweder direkt neben den Genen für das A1A2T-Modul lokalisiert oder an verschiedenen Orten im Genom verstreut. Dementsprechend gibt es Transporter, bei denen einander zugehörige Untereinheiten einen festen Komplex miteinander bilden (Subklasse I) und solche, bei denen verschiedene S-Einheiten abwechselnd mit einem A1A2T-Modul interagieren (Subklasse II) (Rodionov et al., 2009). Eine dritte Gruppe von S-Einheiten, die ausschließlich der BioY-Familie angehören, wurde in Organismen entdeckt, die keinerlei Gene für A- und T-Komponenten enthalten. Im Zusammenhang mit diesen isolierten S-Einheiten wird eine solitäre Transportfunktion von S-Einheiten diskutiert, die in Abschnitt 1.3.5 nähere Erläuterung findet. Die generelle modulare Architektur der ECF-Transporter ist in Abb. 4 dargestellt. Bei Vertretern der Subklasse I liegen die ATPasen entweder als Kopien des gleichen Proteins oder, wie bei Transportern der Subklasse II, als einzeln codierte Proteine vor (Eitinger et al., 2011). ECF-Transporter der Subklasse I, zu denen auch die Kobalt- und Nickeltransporter Cbi/NikMNQO und der Biotintransporter BioM₂NY aus *R. capsulatus* zählen, sind über nahezu alle Gruppen der Prokaryoten verteilt, während die Subklasse II vorrangig in *Firmicutes*, *Thermotogales* und einigen Archaeen zu finden ist. Manche Genome besitzen Gene für ECF-Transporter, die beiden Subklassen zuzuordnen sind und in einigen Organismen wurden bis zu 12 verschiedene S-Einheiten gefunden, deren Substratspezifität in den meisten Fällen vom genomischen Kontext abgeleitet wurde. Die Gene dieser S-Einheiten sind oft mit Genclustern kolokalisiert, die unter der Kontrolle metabolitabhängiger Repressoren, *Riboswitches* oder T-Box-Elemente stehen oder in Biosyntheseprozesse involviert sind (Rodionov et al., 2009; Rodionov et al., 2006). Die Synthese der S-Einheiten wird daher häufig indirekt über ihre eigenen Substrate reguliert und ist somit dem Bedarf angepasst, während die A1A2T-Komponenten der Subklasse II-Transporter meist konstitutiv produziert werden (Rodionov et al., 2009). Die Bildung funktioneller Komplexe aus einem A1A2T-Modul und einzelnen S-Einheiten wurde mittlerweile für etliche ECF-Transporter mit Spezifität für Folat und Pantothenat aus

Leuconostoc mesenteroides und *Bacillus subtilis* (Neubauer et al., 2009; Rodionov et al., 2009), für Thiamin, Niacin und Folat aus *Lactococcus lactis* (Majsnerowska et al., 2015; Rodionov et al., 2009; ter Beek et al., 2011) sowie für Folat, Pantothenat und Pyridoxamin aus *Lactobacillus brevis* (Wang et al., 2015; Wang et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014) experimentell bestätigt.

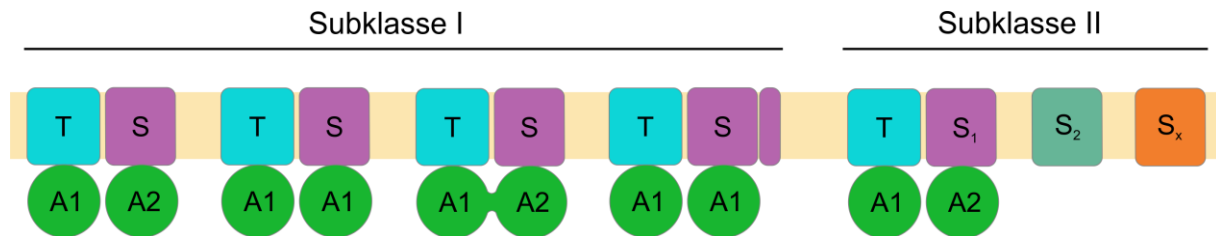


Abb. 4: Schematische Übersicht über die modulare Architektur von ECF-Transportern. ECF-Transporter der Subklasse I bestehen aus einander zugehörigen („dedicated“) Komponenten (ATPasen sowie T- und S-Komponente), die gemeinsam codiert werden. Die ATPasen können Kopien desselben Proteins oder unterschiedliche Proteine (A1, A2) oder fusioniert sein. Metalltransporter besitzen zusätzlich zur S-Einheit ein kleines Membranprotein, das für die Transportfunktion unerlässlich ist (Siche et al., 2010). Bei Transportern der Subklasse II interagieren verschiedene S-Einheiten mit ein und demselben („shared“) EcfA1A2T-Modul.

1.3.2 Struktur und Funktion von S-Einheiten

S-Einheiten sind kleine, etwa 20-25 kDa große Membranproteine, die für die spezifische und hoch-affine Bindung der Substrate zuständig sind und auf Basis der ihnen über den genetischen Kontext vorausgesagten oder nachgewiesenen Substratspezifität mindestens 20 Familien zugeordnet werden (Rodionov et al., 2009). Durch Transportmessungen oder Kristallisation von S-Einheiten mit Liganden wurde die Spezifität für CbiM (Co²⁺) und NikM (Ni²⁺) (Kirsch und Eitinger, 2014; Rodionov et al., 2006; Yu et al., 2014), BioY (Biotin) (Fisher et al., 2012; Hebbeln et al., 2007), FolT (Folat) (Eudes et al., 2008; Rodionov et al., 2009), RibU (Riboflavin) (Burgess et al., 2006; Duurkens et al., 2007; Zhang et al., 2010), ThiT und YkoE (Thiamin) (Erkens et al., 2011; Eudes et al., 2008; Josts et al., 2016; Rodionov et al., 2009) sowie PanT (Pantothenat) (Neubauer et al., 2009) experimentell bestätigt. Bemerkenswert ist, dass alle bekannten S-Einheiten trotz einer Sequenzübereinstimmung von durchschnittlich gerade einmal 11 % und maximal 21 % eine vergleichbare Topologie besitzen, die durch sechs Membranhelices gekennzeichnet ist (s. Abb. 5) (Rodionov et al., 2009). Diese konservierte Proteinfaltung wurde für die meisten S-Einheiten anhand ihrer Aminosäuresequenz vorhergesagt (Rodionov et al., 2009) und mithilfe von Kristallstrukturanalysen für RibU (Zhang et al., 2010), BioY (Berntsson et al., 2012), FolT (Swier et al., 2016; Xu et al., 2013; Zhao et

al., 2015), ThiT (Erkens et al., 2011), YkoE (Josts et al., 2016), PdxU (Wang et al., 2013), PanT (Zhang et al., 2014) und NikM (Yu et al., 2014) belegt. Eine Sonderrolle nehmen die kobalt- und nickelspezifischen S-Einheiten CbiM und NikM ein, die an ihrem N-Terminus eine siebte Membranhelix tragen (s. Abb. 5) (Siche et al., 2010; Yu et al., 2014). Die vitaminspezifischen S-Einheiten lagen in der asymmetrischen Zelle im Kristall stets als Oligomere vor, was aber aufgrund der relativen Orientierung der S-Einheiten als Artefakt und als physiologisch nicht relevant eingestuft wurde.

Die meisten konservierten Aminosäurereste befinden sich im Bereich der TMH4, TMH5 und TMH6 sowie der Schleife zwischen TMH1 und TMH2 (*Loop 1*) (Zhang, 2013). In dieser Region liegen die an der Substratbindung beteiligten Seitenketten, wie aus den Kristallstrukturen der in Abwesenheit von A- und T-Komponenten kristallisierten S-Einheiten ThiT, FolT, RibU, BioY, NikM, YkoE hervorgeht. In einer nach außen gerichteten Bindetasche wurden dort jeweils hohe Elektronendichten gemessen, die auf gebundene Substrate hindeuten (Berntsson et al., 2012; Erkens et al., 2011; Josts et al., 2016; Swier et al., 2016; Yu et al., 2014; Zhang et al., 2010; Zhao et al., 2015). Mit Ausnahme der S-Einheit YkoE des thiaminspezifischen ECF-Transporters YkoEDC aus *B. subtilis* (Josts et al., 2016) liegt der *Loop 1* in diesen beladenen S-Einheiten stets wie ein Deckel auf der Substratbindetasche und ist über konservierte Seitenketten oder ein Amid im Peptidrückgrat direkt an der Substratbindung beteiligt (Zhang, 2013). S-Einheiten binden ihre Substrate mit sehr hoher Affinität, experimentell wurden Dissoziationskonstanten im Bereich von 0,01 bis 10 nM ermittelt (Berntsson et al., 2012; Duurkens et al., 2007; Erkens et al., 2011; Eudes et al., 2008). Beim Mechanismus der Substratbindung stellen die metallspezifischen S-Einheiten mit ihrer zusätzlichen Helix am N-Terminus eine Besonderheit dar. Die Kristallstruktur der nickelspezifischen S-Einheit NikM2 aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* (pdb-Code 4M58) zeigt, dass der N-Terminus auf der extrazellulären Seite wie ein Stöpsel in die Substratbindetasche ragt und dabei über die Aminogruppe des Met-1, das N δ 1-Atom des Imidazolrings und den Peptidstickstoff des His-2 direkt an der Bildung des Ligandenfeldes des Ni²⁺ beteiligt ist (Yu et al., 2014). Der vierte Ligand wird durch das N ϵ 2-Atom eines weiteren Histidinrestes in der ersten extrazellulären Schleife (zwischen TMH2 und TMH3) gestellt. Bereits vor Auflösung der Kristallstruktur von *Ti*NikM2 war die Bedeutung der ersten neun Aminosäuren am N-Terminus für die Metallkoordination an CbiM aus *R. capsulatus* nachgewiesen worden, da der Austausch einzelner Aminosäuren funktionell nicht toleriert wurde (Siche et al., 2010). Die hohe Konservierung dieser Aminosäuren (1MHIMEGFLP₉ in

CbiM und γ MHIPDGFLS₉ in NikM) legt die Vermutung nahe, dass die Bindetasche bei allen Mitgliedern dieser Familie vergleichbar aufgebaut ist (Rodionov et al., 2006; Siche et al., 2010). Eine weitere Besonderheit von CbiM und NikM ist ihre Abhängigkeit von den kleinen Membranproteinen Cbi/NikN, die aus lediglich zwei vorhergesagten Helices und einer dazwischen liegenden, etwa 35 bis 60 Aminosäuren langen Schleifenregion bestehen (Siche et al., 2010). In einigen Fällen existieren natürliche Fusionen zwischen NikM und NikN (Rodionov et al., 2006). Bei einem Großteil der nickelspezifischen ECF-Transporter ist NikN durch das ebenfalls aus zwei mutmaßlichen Helices bestehende NikL ersetzt, welches meist gemeinsam mit dem noch kleineren Membranprotein NikK vorkommt (Zhang et al., 2009). Die Bedeutung der kleinen Komponente war anhand des Kobalttransporters CbiMNQO aus *S. enterica* serovar Typhimurium erkannt worden, dessen Fähigkeit zur Kobaltakkumulation in rekombinante *E. coli*-Zellen von der minimalen Kerneinheit CbiMN abhing (Kirsch und Eitinger, 2014; Rodionov et al., 2006). Da CbiN auch für die Funktion des Kobalttransporters aus *R. capsulatus* unverzichtbar war, gleichzeitig jedoch keinen stabilen Komplex mit den anderen Komponenten CbiMQO bildete, wurde eine transiente Interaktion und Involvierung in die Beladung der Metallbindestelle von CbiM vermutet (Siche et al., 2010).

1.3.3 Struktur ganzer ECF-Transporter

Zu Beginn dieser Arbeit existierten zwei Kristallstrukturen von ECF-Transportern der Subklasse II aus *Lactobacillus brevis*, die aus dem gleichen EcfA1A2T-Modul im Komplex mit verschiedenen S-Einheiten (FolT für Folat, PdxU für Pyridoxamin (Wang et al., 2015)) bestehen (Wang et al., 2013; Xu et al., 2013). Weitere, später veröffentlichte Strukturen repräsentieren das gleiche A1A2T-Modul im Komplex mit der S-Einheit PanT für Pantothenat und den folatspezifischen ECF-Transporter EcfA1A2T-FolT2 aus *Lactobacillus delbrueckii* (Swier et al., 2016). All diese Transporter zeigen die gleiche Zusammensetzung aus einem ATPase-Dimer (EcfA1A2), einer T-Komponente (EcfT) und einer S-Einheit (FolT, PdxU, PanT), die in einer vergleichbaren Topologie angeordnet sind. Die Stöchiometrie der Untereinheiten dieser Komplexe von 1:1:1:1 (A1:A2:T:S) stimmt mit einer früheren, über Lichtstreuungsversuche bestimmten Stöchiometrie eines ECF-Transporters überein (ter Beek et al., 2011). Andere experimentelle Daten hatten dagegen immer wieder Hinweise auf Oligomerformen der T- und S-Komponenten geliefert (Eitinger et al., 2011). So hatten fluoreszenzbasierte Interaktionsstudien an Untereinheiten von BioM₂NY aus *R. capsulatus* *in vitro* und in lebenden *E. coli*-Zellen auf die Existenz von BioY-Oligomeren hingedeutet (Finkenwirth et al., 2010;

Kirsch et al., 2012) und auch von BioN wurden immer wieder Dimere beobachtet (Kirsch, 2015; Neubauer et al., 2011). Für den ECF-Transporter aus *Thermotoga maritima* wurde ebenfalls eine Stöchiometrie von 1:1:2:2 (A1:A2:T:S) vorgeschlagen, die sogar zwei verschiedene S-Einheiten beinhaltet (Karpowich und Wang, 2013).

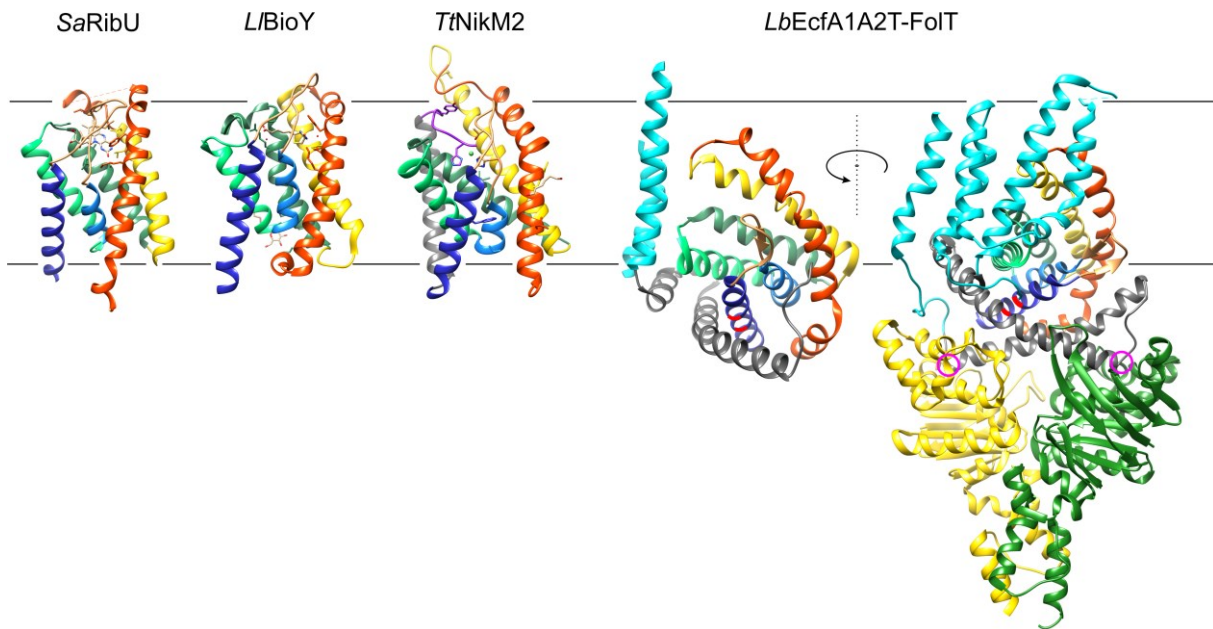


Abb. 5: Kristallstrukturen verschiedener S-Einheiten und eines ECF-Holotransporters. Dargestellt sind die Strukturen der S-Einheiten *SaRibU* (pdb-Code 3P5N), *L/BioY* (pdb-Code 4DVE) und *TtNikM2* (pdb-Code 4M58) sowie des Folattransporters *LbEcfA1A2T-FolT* (pdb-Code 4HUQ). Die in Abwesenheit des EcfA1A2T-Moduls kristallisierten S-Einheiten sind substratbeladen, für sie wird eine senkrecht in der Membran positionierte Topologie angenommen. Die erste extrazelluläre Schleife (*Loop 1*, hellbraun) liegt jeweils wie ein Deckel auf der Substratbindetasche. NikM2 besitzt am N-Terminus eine zusätzliche Helix (grau), deren erste neun Aminosäuren (lila) hoch konserviert sind und in die Bindetasche ragen. Met-1 und His-2 liefern drei der vier Liganden für das Ni^{2+} -Ion (grün). Im Holotransporter ist die S-Einheit (FolT) um fast 90° gekippt und liegt auf den grau markierten Kopplungshelices (CH2 und CH3) der T-Komponente (türkis) auf, die Substratbindetasche ist zum Zytoplasma hin geöffnet und entleert. Das als AxxxA-Motiv bezeichnete Interaktionsmotiv in der ersten Membranhelix (blau) der S-Einheit ist rot markiert. Die Arginin-Motive (xRx), über die die beiden ATPasen (A1, gelb und A2, dunkelgrün) mit den CHs verankert sind, sind durch pink gefärbte Ringe markiert. Die Abbildung wurde unter Nutzung der oben genannten pdb-Codes mit der Modellierungs-Software SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014) erstellt.

Die Kristallstruktur des Folattransporters in Abb. 5 zeigt, dass die T-Komponente über ihre Kopplungshelices (CHs) mit beiden ATPase-Untereinheiten in Verbindung steht. Dies stellt einen signifikanten Gegensatz zu kanonischen ABC-Importern dar, bei welchen die ATPasen jeweils mit einer der TMDs interagieren (Eitinger et al., 2011). T-Komponenten sind mit vier

bis acht moderat konservierten Membranhelices in der Membran verankert und die drei zytoplasmatischen CHs stellen die am stärksten konservierten Bereiche dieser Proteine dar (Eitinger et al., 2011). Am C-Terminus der CH2 und CH3, die überkreuzt sind und parallel zur Membran liegen, befinden sich zwei streng konservierte Argininreste (xRx-Motiv, x steht für eine beliebige AS), die jeweils in eine saure Tasche in der helikalen Domäne der ATPasen ragen. Der Austausch beider Arginine hatte beim Biotintransporter BioM₂NY aus *R. capsulatus* den kompletten Zerfall des Komplexes zur Folge (Neubauer et al., 2009) und beim Pantothenattransporter EcfA1A2T-PanT aus *L. brevis* einen vollständigen Verlust der Transportaktivität bewirkt (Zhang et al., 2014). Die Kopplungshelices der T-Komponente stehen außerdem über ausgedehnte Interaktionsflächen mit den helikalen Domänen der ATPasen in Verbindung. Die ATPasen besitzen wie die NBDs aller ABC-Transporter eine helikale und eine RecA-ähnliche (katalytische) Domäne und enthalten dementsprechend die in Abschnitt 1.2.3 vorgestellten und für ABC-ATPasen typischen Motive Walker A, Walker B, das *Switch*-Motiv, den *D-Loop* und das Signaturmotiv (LSGGQ) (Karpowich und Wang, 2013). Aus den Strukturen der Holotransporter und der ATPase-Dimere aus *T. maritima*, die mit ADP und AMP-PNP kristallisiert wurden (Karpowich et al., 2015; Karpowich und Wang, 2013), geht eine Anordnung der beiden ATPase-Untereinheiten in entgegengesetzter Orientierung hervor, die auf einen mit kanonischen ABCs vergleichbaren Mechanismus der ATP-Bindung und -Hydrolyse hindeutet. Eine Besonderheit der ECF-ATPasen stellt die sogenannte Q-Helix dar, eine kurze Sequenz an der Interaktionsfläche beider ATPasen, die durch eine kurze Windung aus den konservierten Aminosäuren xPD/ExQϕ (x kann jede beliebige AS und ϕ eine hydrophobe AS sein) charakterisiert ist. Die Seitenketten der konservierten Aminosäuren sind in den Kristallstrukturen häufig in Wasserstoffbrücken mit umgebenden Resten in der helikalen und der katalytischen Domäne involviert. Da der Austausch des namensgebenden Glutamins beim Riboflavintransporter aus *T. maritima* die Transportfunktion komplett deaktiviert hatte, wurde eine stabilisierende Funktion dieser Region für das ATPase-Dimer und die Bindung zwischen den ATPasen und der T-Komponente vermutet (Karpowich und Wang, 2013).

Die erstaunlichste Offenbarung der Kristallstrukturen ist die Lage der S-Einheit und die Art, wie diese mit der T-Komponente interagiert. Anders als die Kristallstrukturen und die Topologie einzelner S-Einheiten vermuten lassen, liegen diese im Holotransporter nahezu um 90° gekippt in der Membran (Swier et al., 2016; Wang et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014). Die Schleife, die die ersten beiden Helices verbindet (*Loop* 1) und bei den substratbeladenen S-Einheiten an der Koordination der Substrate beteiligt ist, ragt bei den Holotransportern ins

Zytoplasma und die Bindetasche ist geöffnet und damit substratfrei. Die erste, zweite und sechste Helix der S-Einheit bilden eine hydrophobe Rinne, die auf einer durch CH2 und CH3 der T-Komponente gebildeten Ebene aufliegt. Die eigentlich extrazellulären Schleifen (*Loop* 3 und 5) treten mit TMH3 und TMH4 der T-Komponente in Kontakt (Zhang, 2013). Die hydrophobe Kontaktfläche wird als strukturelles Schlüsselmerkmal von S-Einheiten der Subklasse II gesehen, die trotz der geringen Sequenzübereinstimmung eine Interaktion verschiedener S-Einheiten mit dem gleichen A1A2T-Modul ermöglichen könnte (Zhang et al., 2014). In der ersten Helix von S-Einheiten der Subklasse II taucht ein kurzes, konserviertes hydrophobes Motiv auf (AxxxA), das durch zwei Alanine oder andere kleine hydrophobe Aminosäuren und drei dazwischen liegende beliebige Reste charakterisiert ist. Solche hydrophoben Motive sind häufig an der Interaktion von Membranhelices beteiligt, da sie eine dichte Packung der Helices erlauben (Cymer et al., 2012; Kleiger et al., 2002). Bei der thiaminspezifischen S-Einheit ThiT aus *L. lactis* hatte der Austausch der Alanine gegen Tryptophan die Komplexstabilität des Holotransporters massiv gestört und die Transportaktivität komplett inhibiert (Erkens et al., 2011). Eine ähnliche Wirkung wurde bei PanT aus *L. brevis* beobachtet (Zhang et al., 2014). Ob ein solches Motiv bei S-Einheiten von ECF-Transportern der Subklasse I vorkommt und eine vergleichbare Bedeutung für die Interaktion der Komponenten hat, war bisher unklar und sollte als ein Aspekt in dieser Arbeit untersucht werden.

1.3.4 Ein hypothetisches Transportmodell für ECF-Transporter

Bevor mit den ersten Kristallstrukturen Einblicke in die topologische und strukturelle Organisation der ECF-Holotransporter möglich waren, wurde von einem Mechanismus ähnlich dem kanonischer ABC-Transporter ausgegangen, bei denen das Substrat durch eine Translokationspore die Membran passiert. Da S-Einheiten mit nur sechs Membranhelices für einen Transportkanal vermutlich zu klein sind, war ein Pfad an der Grenzfläche zwischen T- und S-Einheit oder dimeren S-Einheiten angenommen worden (Finkenwirth et al., 2010; Zhang et al., 2010). Auf der Basis der liegenden Topologie der S-Einheiten in den Transporter-Komplexen wurde jedoch die Hypothese aufgeworfen, S-Einheiten könnten ihr Substrat durch einen gänzlich neuen Mechanismus in einer Kippbewegung über die Membran befördern, mit der die Substratbindestelle selbst von außen nach innen bewegt wird (s. Abb. 6) (Xu et al., 2013). Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass die Substratbindestellen der liegenden S-Einheiten leer und geöffnet sind, wohingegen die solitär kristallisierten S-Einheiten

substratbeladen vorliegen und vermutlich annähernd senkrecht in der Membran orientiert sind (vgl. Abb. 5). Die Hypothese einer Drehbewegung vollständiger Membranhelices in der Membran wirft die Frage auf, wie die äußeren polaren Regionen die energetische Hürde des hydrophoben Membrankerns überwinden können (Slotboom, 2014). Anhand der thiaminspezifischen S-Einheit ThiT aus *L. lactis* und der folatspezifischen S-Einheiten FolT aus *L. brevis*, FolT aus *Enterococcus faecalis* sowie FolT1 und FolT2 aus *L. delbrueckii* wurde gezeigt, dass die Substratbindung durch die S-Einheiten mit minimalen strukturellen Veränderungen einhergehen, die hauptsächlich die extrazellulären *Loops* 1 und 3 betreffen (Majsnerowska et al., 2013; Swier et al., 2016; Zhao et al., 2015). Es wird daher angenommen, dass die substratbeladenen S-Einheiten mit ihren auf die Bindetasche geklappten Schleifenregionen eine kompakte Konformation einnehmen, in der sie an der T-Komponente herunter gleiten und so in die liegende Position gelangen könnten. Auf der Basis der ersten 3D-Strukturen ganzer ECF-Transporters wurde außerdem vorgeschlagen, dass die Aufrichtung der gekippten S-Einheiten durch ATP-Bindung an die ATPasen über eine bisher nicht charakterisierte Konformationsänderung der Kopplungshelices der T-Komponente vermittelt wird (Xu et al., 2013). Da es für diesen Kippmechanismus bisher jedoch keinerlei experimentelle Daten gab, war das Modell zu Beginn dieser Arbeit rein spekulativ.

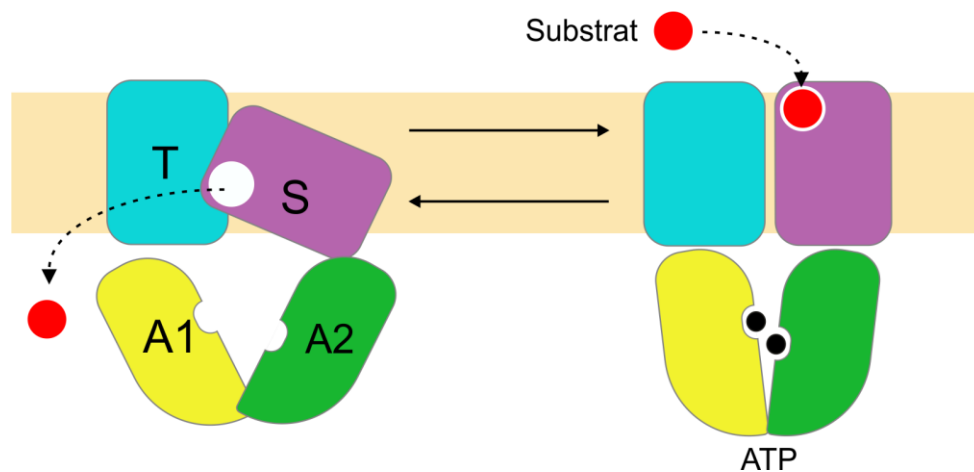


Abb. 6: Hypothetisches Transportmodell für ECF-Transporter. Im Ruhezustand des Transporters ist die S-Einheit gekippt und die Substratbindestelle zum Zytosol hin geöffnet. ATP-Bindung an die ATPasen führt zur Umlagerung der S-Einheit in eine aufrechte Position, die eine Substratbindung erlaubt. Durch ATP-Hydrolyse kehrt der Komplex in den Ausgangszustand zurück und das Substrat wird ins Zytosol freigesetzt.

1.3.5 Transport durch solitäre S-Einheiten

Messungen der Biotinakkumulation durch *E. coli*-Zellen, die solitäres BioY oder BioM₂NY aus *R. capsulatus* produzierten, hatten zu dem Vorschlag geführt, dass BioY ohne BioM₂N einen Transporter mit niedriger Affinität und hoher Kapazität darstellt, der durch Komplexbildung mit BioM₂N in einen hochaffinen Transporter überführt wird (Hebbeln et al., 2007). Eine Substratakkumulation ohne EcfA1A2T-Modul wurde auch für die S-Einheit CbiM des Kobalttransporters aus *R. capsulatus* (RcCbiMNQO) beschrieben, wenn die kleine Komponente CbiN mit anwesend war (Rodionov et al., 2006; Siche et al., 2010). Da die Messung zellassoziierter Radioaktivität jedoch keinen direkten Nachweis eines tatsächlichen Substrattransports in die Zellen liefern kann und der Transport durch einige andere S-Einheiten von einem EcfA2A2T-Modul abhing, wurde eine solitäre Transportfunktion angezweifelt. Kinetische Analysen der Substratakkumulation durch BioY-Proteine aus *L. lactis* und *R. capsulatus* in Liposomen deuteten darüber hinaus eher auf eine Bindung hin (Berntsson et al., 2012). Durch einen intrazellulären Urease-Aktivitätstest in *E. coli*, der von der Aufnahme des Urease-Kofaktors Nickel durch rekombinant produzierte Nickeltransporter abhing, wurde die Transportfunktion von CbiMN und NikMN jedoch eindeutig nachgewiesen (Kirsch und Eitinger, 2014). Als stützendes Argument für eine Transportfunktion solitärer BioY-Proteine wurde das häufige Auftreten von *bioY*-Genen in Organismen angesehen, die keine Gene für A- und T-Komponenten besitzen (Eitinger et al., 2011). So besitzt zum Beispiel *Chlamydia trachomatis* ein solitäres BioY, das nach Produktion in *E. coli* zu einer signifikanten Biotinakkumulation führte (Fisher et al., 2012). Als denkbar wurde in Erwägung gezogen, dass die bei BioY aus *R. capsulatus* (Finkenwirth et al., 2010; Kirsch et al., 2012) und *C. trachomatis* sowie einigen immer solitär vorkommenden BioY-Proteinen (Kirsch, 2015) beobachtete Dimerisierung einen Kippvorgang innerhalb des Homodimers begünstigen könnte. Bei den metallspezifischen CbiMN- und NikMN-Einheiten könnte die Interaktion zwischen der S-Einheit (CbiM, NikM) mit dem jeweiligen kleinen Membranprotein (CbiN, NikN) einen wesentlichen Aspekt bei der Substrattranslokation ohne EcfA1A2T-Modul darstellen.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Der vorgeschlagene Kippmechanismus der S-Einheiten war zu Beginn dieser Arbeit rein hypothetisch und basierte allein auf dem Vergleich der Topologien einzelner und im Komplex der Holotransporter kristallisierter S-Einheiten. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, das

postulierte Modell experimentell zu prüfen und die vorgeschlagene Drehbewegung der S-Einheit in der Membran nachzuweisen. Der Biotintransporter BioM₂NY aus *R. capsulatus* bot ein geeignetes Untersuchungssystem für dieses Vorhaben, da er einen der am besten charakterisierten ECF-Transporter darstellt und stabil isoliert werden kann. Mit der Rekonstitution des Transporters in Nanodiscs sollte eine der nativen Membran möglichst nahekommende Umgebung geschaffen werden, in der dynamische Aspekte der Substratbindung und -abgabe beleuchtet werden können. Nanodiscs sind kleine Lipidscheibchen, die von einem amphipathischen Gürtelprotein zusammen gehalten werden. Methodisch kamen chemische Quervernetzung, Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie zur Analyse von Konformationsänderungen sowie die Quantifizierung der Bindung und Freigabe von [³H]Biotin zur Anwendung. Zum Nachweis der Transportfunktion veränderter Transporter sowie natürlicherweise solitärer BioY-Varianten wurde ein biotinauxotropher und intrinsisch transportdefizienter *E. coli*-Stamm konstruiert.

2. Ergebnisse

2.1 Ein Indikatorstamm zum Nachweis der Transportaktivität modifizierter Biotintransporter

Die Beurteilung der tatsächlichen Funktion von Transportproteinen ist schwierig, da sie einen Nachweis der Substrattranslokation durch die Membran erfordert. Durch Bestimmung der ATPase-Aktivität modifizierter BioM₂NY-Varianten lassen sich zwar Aussagen über deren Funktionszustand ableiten, direkte Schlüsse über ihre Fähigkeit, Biotin-Moleküle über die Zytoplasmamembran in das Zellinnere zu transportieren, sind mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Da auch die Messung der Aufnahme von radioaktivem Biotin durch Zellen wegen der kaum möglichen Unterscheidbarkeit zwischen Substratbindung und Substrattranslokation uneindeutige Ergebnisse liefert, wurde ein alternatives Verfahren gewählt. Ein biotinauxotropher und intrinsisch -transportdefizienter *E. coli*-Stamm erschien als geeignetes Testsystem, um die Transportaktivität rekombinant produzierter Biotintransporter zu überprüfen. Ein solches System war auch geeignet, die postulierte Transportaktivität von BioY-Proteinen zu überprüfen, die natürlicherweise ohne A- und T-Komponenten existieren. Da *E. coli* K-12 selbst keine ECF-Transporter besitzt, war ein solcher Stamm vielversprechend.

2.1.1 Konstruktion und Charakterisierung eines biotinauxotrophen und – aufnahmedefizienten Indikatorstammes

Biotin ist ein Kofaktor bei Prozessen, in denen Carboxylgruppen übertragen werden, und damit ist es unverzichtbar für Reaktionen wie beispielsweise die initialen Schritte der Fettsäuresynthese (Zempleni und Kuroishi, 2012). Über seine Valerylseitenkette ist es als prosthetische Gruppe an die ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysinrestes von Carboxylasen gebunden, die übertragbare Carboxylgruppe befindet sich am N8-Stickstoffatom des Ureidorings, der mit dem Tetrathiophenring ein bizyklisches Ringsystem bildet. In *E. coli* ist das einzige permanent biotinylierte Enzym die *Biotin carboxyl carrier*-Domäne (AccB) des Acetyl-CoA-Carboxylase-Holoenzym (Choi-Rhee et al., 2004). *E. coli* besitzt sowohl die Fähigkeit zur Biosynthese als auch zum Import von Biotin und nachdem bereits vor Jahrzehnten Kandidatengene für einen Transporter in der *ilv-metE*-Region eingegrenzt worden waren (Eisenberg, 1975), konnte der hochaffine Biotintransporter YigM vor wenigen Jahren schließlich identifiziert werden (Ringlstetter, 2010). YigM ist ein etwa 34 kDa großes Protein

aus 10 TMHs aus der Familie der Carboxylat/Aminosäure/Amin-Transporter, für das eine Michaelis-Konstante von 74 ± 14 nM experimentell bestimmt wurde (Ringlstetter, 2010).

In einem Indikatorstamm, dessen Fähigkeit zu wachsen vom Biotintransport durch rekombinante Biotintransporter abhängen sollte, musste sowohl die Biotinsynthese als auch der intrinsische Importmechanismus für Biotin ausgeschaltet werden. Ausgangspunkt für die Konstruktion dieses Stammes war *E. coli* JW3375-1 aus der Keio-Kollektion (Baba et al., 2006), welcher aufgrund einer Deletion des Biotinsynthesegens *bioH* und dessen Ersatz durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ($\Delta bioH::km$) biotinauxotroph ist. Die Biotinsynthese leitet sich als Seitenweg von der Fettsäuresynthese ab und beginnt in *E. coli* mit der Übertragung einer Methylgruppe auf Malonyl-CoA durch BioC. Die Kondensation dieses Malonyl-Methylesters mit Malonyl-ACP durch den Fettsäure-Synthase-Komplex führt unter Decarboxylierung zum 3-Oxoglutaryl-ACP-Methylester, einem methylierten C₅-Dicarbonsäure-Derivat. Nach Reduktion/Dehydratation/Reduktion führt ein weiterer C₂-Verlängerungszyklus zum Pimeloyl-ACP-Methylester (Lin und Cronan, 2012). Die Methylesterase BioH terminiert schließlich die Kettenverlängerung durch Hydrolyse des Methylesters und speist damit das Intermediat Pimeloyl-ACP in die ab dann universelle Biotinsynthese ein, in der der Aufbau des Ringgerüsts und der Einbau des Schwefelatoms erfolgen (Abb. 7) (Lin und Cronan, 2011).

Um in *E. coli* JW3375-1 zusätzlich zu BioH den Biotintransporter YigM zu eliminieren, wurde zunächst die Kanamycin-Resistenzkassette aus der $\Delta bioH::km$ -Region entfernt. Dies erfolgte über FLP-abhängige Rekombination der FRT-Sequenzen (*flp recognition target*), die sich stromaufwärts und –abwärts des Resistenzgens befinden (vgl. Abschnitt 4.12.3). Nach Entfernung der Kanamycin-Resistenzkassette aus dem *bioH*-Lokus wurde im nächsten Schritt *yigM* durch ein $\Delta yigM::km$ -Allel ersetzt. Zur Vermeidung des befürchteten Letal-Phänotyps einer biotinauxotrophen Mutante ohne Biotintransporter wurde zuvor jedoch ein *Bypass* etabliert, der in Gegenwart exogenen Pimelats die Synthese des Pimeloyl-Thioesters ermöglichte. Hierzu wurde in Vorarbeiten von F. Kirsch (Kirsch, 2015) *pimA* aus *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 kloniert, dessen Produkt als Pimeloyl-CoA-Ligase natürlicherweise den Abbau von C₇-Dicarbonsäuren einleitet, die aus dem anaeroben Aromatenabbau stammen (Harrison und Harwood, 2005). Abb. 7 B zeigt, dass die Expression von *pimA* in rekombinanten $\Delta bioH$ -*E. coli*-Zellen in Gegenwart von Pimelat Wachstum in biotinfreiem Medium ermöglicht. Es wurde gefolgert, dass Pimeloyl-CoA anstelle des

natürlichen Pimeloyl-ACP als Intermediat für die späten Biotin-Synthese-Schritte verwendet wird.

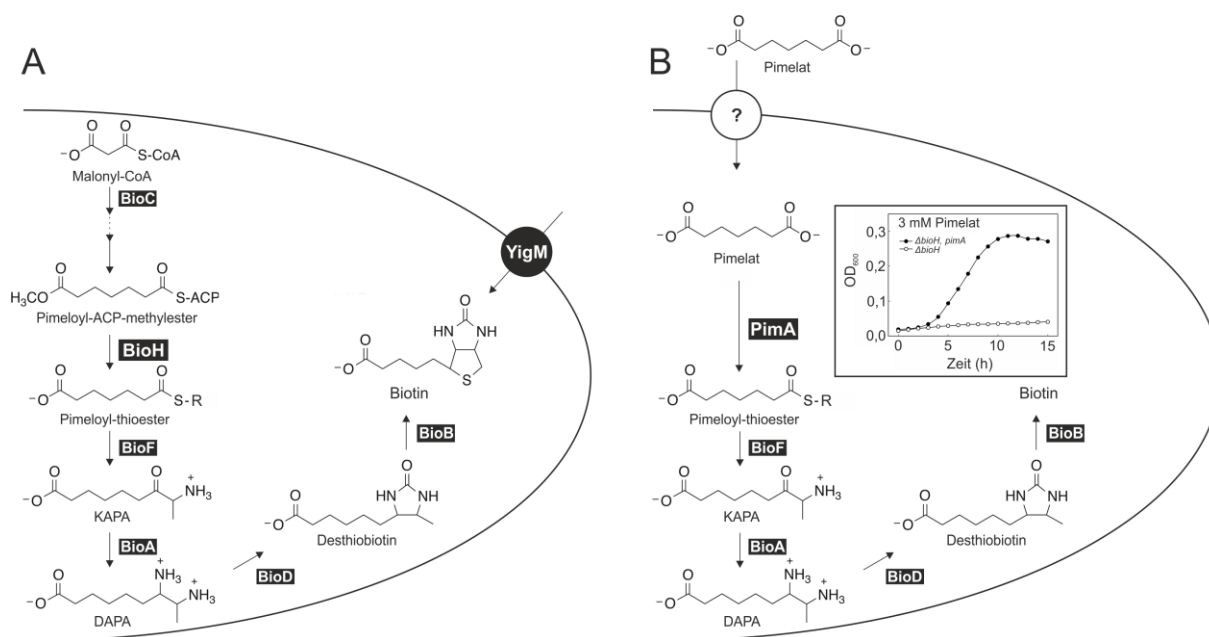


Abb. 7: Biotinmetabolismus in *E. coli* und Komplementation der bei BioH unterbrochenen Synthese durch PimA. Die Biotinsynthese in *E. coli* (A) beginnt mit der Übertragung einer Methylgruppe auf Malonyl-CoA durch BioC. Durch zweifache Kondensation des Methylesters mit Malonyl-ACP und Reduktion der 3-Ketogruppe über die Enzyme der Fettsäuresynthese entsteht ein Pimeloyl-ACP-methylester, dessen weitere Kettenverlängerung durch die Methylesterase BioH über Abspaltung der Methylestergruppe terminiert wird. An den Pimeloylrest wird mithilfe von BioFADB das Ringsystem aufgebaut. Die Unterbrechung der Biotinsynthese bei BioH wird durch Erzeugung des Pimeloyl-thioesters aus freier Pimeloylsäure durch die Carbonyl:CoA-Ligase PimA aus *R. palustris* kompensiert (B). Die PimA-tragende BioH-Mutante ist damit zum Wachstum auf Minimalmedium mit 3 mM Pimelat in der Lage. Die Kurven zeigen repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei Wachstumsexperimenten in Mikrotiterplatten. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2013).

Mithilfe λ Red-vermittelter Rekombination erfolgte die Deletion des *yigM*-Gens in *E. coli* $\Delta bioH$ *pimA*⁺. Hierzu wurde die $\Delta yigM::km$ -Region mit genomischer DNA des *E. coli*-Stammes JW3803-2 ($\Delta yigM::km$, Keio-Kollektion) (Baba et al., 2006) als Matrize amplifiziert und das Amplifikat per Elektroporation in den $\Delta bioH$ -Stamm eingebracht, der die λ Red-Enzyme Exo, Bet und Gam enthielt. Kanamycinresistente Klone, in denen *yigM* mithilfe des λ Red-Systems durch $\Delta yigM::km$ ersetzt worden war, wurden per PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf die korrekte Länge der inserierten Kassette getestet und entsprechende Klone auf Agarplatten mit Kanamycin und Pimelat isoliert. Für eine detaillierte Beschreibung der Methode sei auf Abschnitt 4.12 verwiesen. Die *bioH/yigM*-Doppelmutante war im Gegensatz zu ihrem Elternstamm ($\Delta bioH$), der *yigM* noch trug, nicht in der Lage, auf

Minimalmedium mit niedriger Biotinkonzentration (4 nM) zu wachsen (Abb. 8). Der Vergleich des Wachstums beider Stämme zeigte deutlich, dass die Deletion von *yigM* mit einer Einbuße des affinen Biotintransportes verbunden war. Wie die *bioH*-Mutante und der Elternstamm der Keio-Kollektion (*E. coli* BW25113, in Abb. 8 mit Wildtyp bezeichnet), war auch die Doppelmutante in der Lage, auf LB-Medium zu wachsen, das Biotin in nicht definierter hoher Konzentration enthält. Dies deutete auf einen von YigM unabhängigen, niedrigaffinen Importmechanismus für Biotin hin und ermöglichte die Kultivierung des $\Delta bioH \Delta yigM$ -Stammes unabhängig von PimA und Pimelat. Die Deletion von *yigM* wurde daraufhin in der *bioH*-Mutante in Abwesenheit von PimA erneut erzeugt. Um sekundäre Effekte der Mutagenese als Ursache für den Phänotyp auszuschließen, wurde überprüft, ob die Deletionen durch plasmidlokalisiertes *bioH* (in biotinfreiem Mineralmedium) bzw. *yigM* (in Mineralmedium mit Biotin in Spurenkonzentration) komplementiert werden. Die in Abb. 8 gezeigten Ergebnisse belegen diese Komplementation in beiden Fällen.

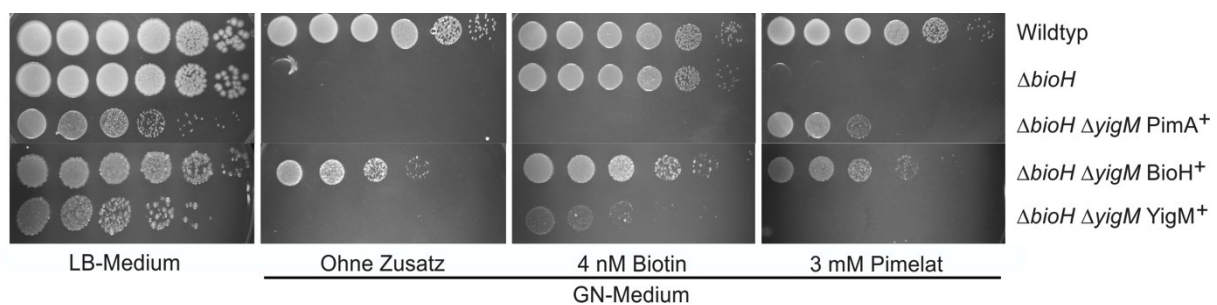


Abb. 8: Wachstum der biotinauxotrophen und -importdefizienten *E. coli*-Stämme. Die Deletion von *bioH*- hatte den Verlust der Biotinsynthese zur Folge, welche mit PimA und Pimelat (3 mM) wieder hergestellt werden konnte. Die Deletion von *yigM* zeigte, dass YigM für ein Wachstum auf niedrigen Biotinkonzentrationen (4 nM) essentiell ist. Die Expression plasmidlokalisierter *bioH*- und *yigM*-Gene kompensierte die jeweilige Deletion. Vorkulturen in LB-Medium mit 1 mM IPTG und 3 mM Pimelat wurden dreimal in Phosphatpuffer gewaschen, auf eine vergleichbare Zellzahl gebracht und anschließend seriell bis 10^{-5} verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde 15 μ l auf eine Agarplatte getropft. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2013).

Abb. 9 zeigt das Wachstum des $\Delta bioH \Delta yigM$ -Stammes bei unterschiedlichen Biotinkonzentrationen in Flüssigkultur. Während die YigM-tragende *bioH*-Mutante noch auf geringsten Mengen von Biotin (1 nM) wuchs, zeigte die Doppelmutante erst ab 10 nM merkliches Wachstum, wenngleich eine niedrigere End-Zelldichte erreicht wurde als durch ihrem Elternstamm. Ein vergleichbares Wachstum beider Stämme wurde erst zwischen 100 nM und 1 μ M Biotin erreicht. Wachstum mit Biotin im Konzentrationsbereich von 1-10 nM war

offenbar nur in Gegenwart eines hochaffinen Biotintransporters, natürlicherweise YigM, möglich.

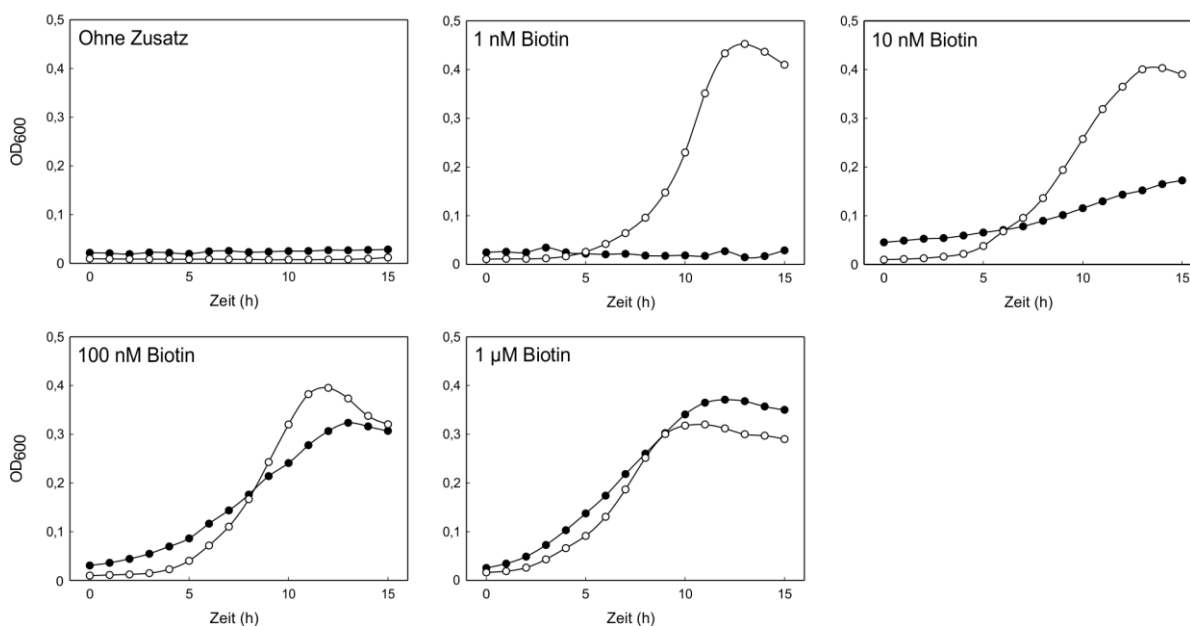


Abb. 9: Biotinabhängiges Wachstum der *E. coli*-Stämme $\Delta bioH$ (weiß) und $\Delta bioH \Delta yigM::km$ (schwarz). Die Stämme wurden aus einer Vorkultur in LB-Medium dreimal in Phosphatpuffer gewaschen und auf eine vergleichbare Anfangszellkonzentration gebracht. Die Wachstumskurven zeigen repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei Experimenten in Mikrotiterplatten. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2013).

2.1.2 *E. coli* $\Delta bioH \Delta yigM::km$ als Referenzstamm zum Nachweis von Biotintransportprozessen

Da das Wachstum der *bioH/yigM*-Doppelmutate in Mineralmedium mit 1 nM Biotin offenbar von einem hochaffinen Transporter abhing, erschien der Stamm als ein geeignetes Indikatorsystem für den Nachweis der Transportaktivität rekombinanter Biotintransporter. Um diese Hypothese zu testen, wurde überprüft, ob BioM₂NY aus *R. capsulatus*, der in der Vergangenheit als hochaffines Importsystem für Biotin mit einer Halbsättigungskonstante von 5 nM beschrieben worden war (Hebbeln *et al.*, 2007), ein Wachstum des Stammes auf 1 nM Biotin wieder herstellen konnte. Zellen, die *bioMNY* auf einem Ampicillinresistenz vermittelnden Plasmid (s. Tab. 2) trugen, wurden in Mineralmedium mit Biotinüberschuss (1 μ M) angezogen, gewaschen und anschließend mit verschiedenen Biotinkonzentrationen weiter inkubiert und das Wachstum aufgezeichnet (Abb. 10). Ohne Biotinzugabe war weder mit noch ohne BioM₂NY ein Wachstum möglich. Mit 1 nM Biotin wuchs nur der Stamm, der *bioMNY* exprimiert und bei 100 nM war das Wachstum beider Stämme nahezu vergleichbar. Der klare

Wachstumsvorteil auf Spuren von Biotin (1 nM) unter Produktion von BioM₂NY belegte die hochaffine Transportaktivität dieses ECF-Transporters und zeigte, dass ein Nachweis rekombinanter Biotintransporter mit diesem Indikatorstamm *in vivo* möglich war. Damit war ein Instrument geschaffen, mit dem eine eindeutige Unterscheidung eines Transports von einer Bindung möglich war, die Methoden wie beispielsweise die Biotinakkumulation durch Transportproteine in Liposomen oder ganzen Zellen nicht liefern konnten.

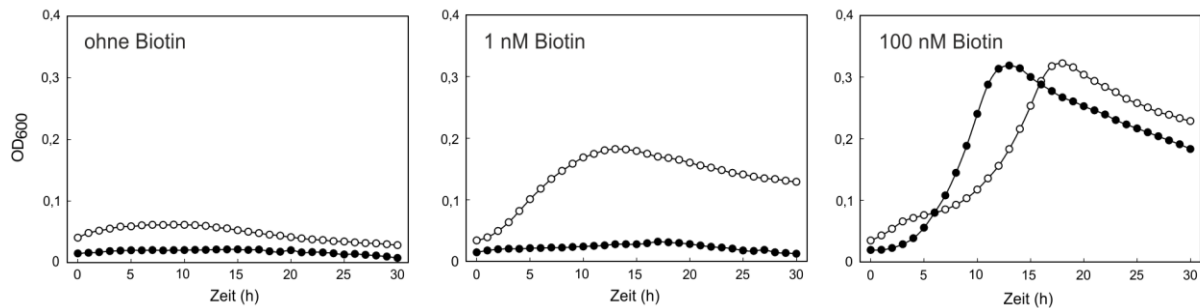


Abb. 10: Biotinabhängiges Wachstum der *bioH/yigM*-Doppelmutante unter Produktion von BioM₂NY aus *R. capsulatus*. Zellen einer in Minimalmedium mit 1 µM Biotin und Ampicillin angezogenen Vorkultur wurden dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen, ohne Biotin bis zum Erreichen des maximalen Wachstums weiter inkubiert und schließlich in Minimalmedium mit verschiedenen Biotinkonzentrationen auf eine vergleichbare Ausgangszellkonzentration gebracht. Die Abbildungen zeigen repräsentative Wachstumskurven des *bioM₂NY* (weiß) exprimierenden oder einen Leervektor (schwarz) tragenden Referenzstammes. Die Experimente wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt und mindestens dreimal reproduziert. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2013).

2.1.3 Transportaktivität solitärer BioY-Proteine ohne ECF-Modul

Da die *bioH/yigM*-Mutante den zweifelsfreien Nachweis einer Biotintranslokation in die Zelle ermöglichte, war dieses System zur Klärung der kontrovers diskutierten Frage geeignet, ob BioY-Proteine ohne A- und T-Komponenten Biotin transportieren können. Für solitäres RcBioY war in der Vergangenheit eine Transportfunktion unabhängig von BioM₂N diskutiert worden, die auf der Akkumulation von radioaktiv markiertem Biotin durch BioY produzierende Zellen beruhte (Hebbeln *et al.*, 2007). Auf der gleichen experimentellen Basis war für BioY aus *Chlamydia trachomatis* eine solitäre Funktion nachgewiesen worden (Fisher *et al.*, 2012). Wie CtBioY kommen etwa ein Drittel aller bekannter BioY-Proteine in Organismen vor, in denen keine Gene für A- und T-Komponenten gefunden werden konnten (Hebbeln *et al.*, 2007). Daher war vermutet worden, dass diese Varianten allein für den Biotintransport verantwortlich sein

könnten. Um diese Frage zu klären, wurde die Transportaktivität von acht solitären BioY-Proteinen aus Organismen ohne A- und T-Komponenten in *E. coli* $\Delta bioH \Delta yigM::km$ überprüft.

Die *bioY*-Gene aus den α -Proteobakterien *Bradyrhizobium japonicum*, *Oceanicola batsensis*, *Silicibacter pomeroyi*, *Roseobacter denitrificans*, *Rhodopseudomonas palustris* und *Roseovarius nubinhibens* waren in früheren Arbeiten von Franziska Kirsch amplifiziert und in Ampicillinresistenz vermittelnde Expressionsplasmide (vgl. Abschnitt 4.2) eingefügt worden (Kirsch, 2015). Alle BioY-Varianten bewirkten die Akkumulation von radioaktiv markiertem Biotin nach Produktion in *E. coli* $\Delta bioH \Delta yigM::km$ (Abb. 11A). Vier BioY-Derivate wurden hergestellt, die durch den Austausch hochkonservierter Aminosäurereste in der Biotinbindestelle in der sechsten TMH inaktiviert worden waren. Ein Sequenzvergleich von etwa 400 in der SEED-Datenbank (Overbeek et al., 2005) hinterlegten BioY-Sequenzen hatte zur Identifikation eines konservierten Motivs (FxxxDxxK) in der sechsten Helix von BioY geführt und in *RcBioY* hatte der Austausch des Asp-164 gegen Asparagin oder des Lys-167 gegen Arginin zu einem kompletten Funktionsverlust geführt (Kirsch et al., 2012). Bei *BjBioY* und *RdBioY* führte jeweils der Einzelaustausch des Lysinrestes gegen Arginin zur völligen Inaktivierung der Biotinbindung, bei *ObBioY2* und *SpBioY2* war ein zusätzlicher Austausch des Aspartatrestes gegen Asparagin nötig (Abb. 11A). Durch die Einzel- bzw. Doppelaustausche waren die vier BioY-Varianten vollständig inaktiv, eine Biotinakkumulation nach Produktion in *E. coli* $\Delta bioH \Delta yigM::km$ war nicht mehr möglich. Wachstumsanalysen des $\Delta bioH/\Delta yigM$ -Stammes zeigten schließlich, dass die acht funktionellen BioY-Proteine zweifelsfrei Biotin in die Zellen transportierten, da sie die Fähigkeit des Referenzstammes, unter Biotinlimitation (1 nM Biotin) zu wachsen, wieder herstellten (Abb. 11C). Zellen mit inaktiven BioY-Derivaten wuchsen dagegen bei dieser Konzentration nicht. Eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse gegen die FLAG-markierten BioY-Proteine in Zellmembranen zeigte, dass alle funktionellen und inaktiven BioY-Varianten in vergleichbaren Mengen produziert wurden (Abb. 11B). Dies belegte, dass die mangelnde Transportfunktion der inaktiven Varianten nicht von einer fehlerhaften oder verringerten Proteinproduktion herrührte. Eine unspezifische Biotinpassage beispielsweise als Folge einer Aggregation von BioY-Proteinen in der Membran konnte somit ausgeschlossen werden, da die Biotinaufnahme mit der Produktion funktioneller BioY-Proteine verbunden war.

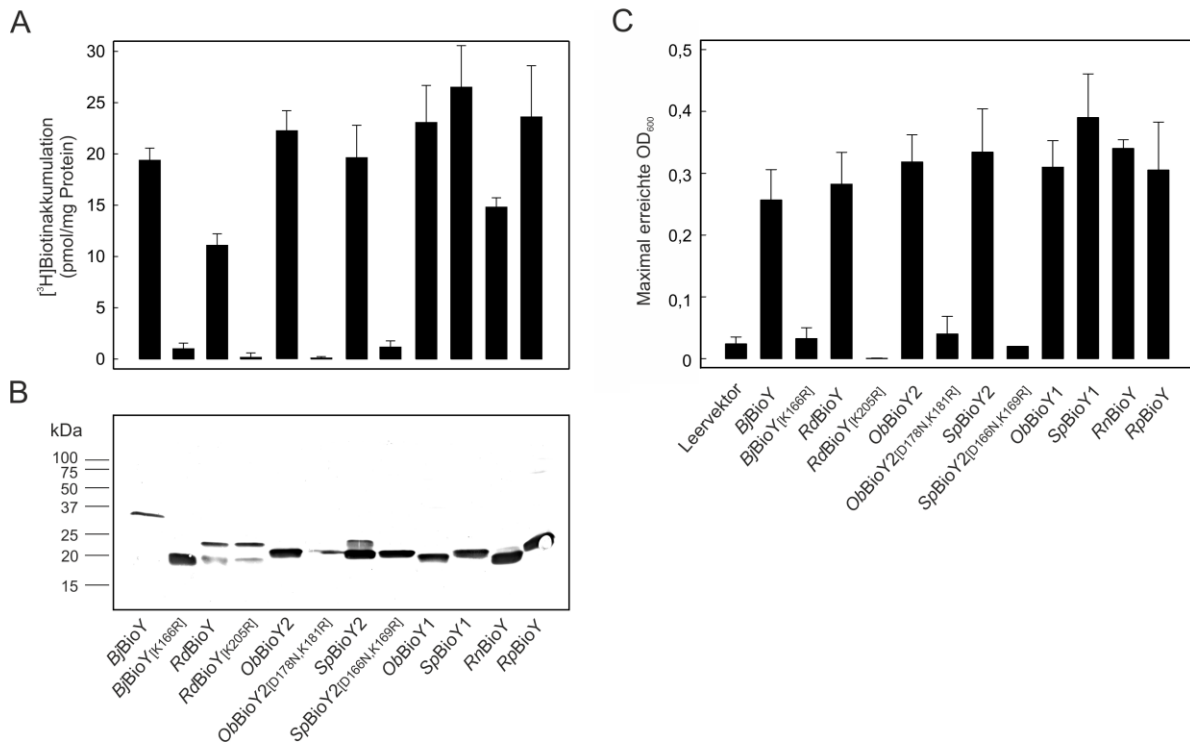


Abb. 11: Biotinbindung und -transport durch solitäre BioY-Proteine. A) In LB-Medium mit Ampicillin und 1 mM IPTG angezogene Zellen ($OD_{578} \approx 5$) wurden dreimal in 35 mM Phosphatpuffer gewaschen und anschließend für 3,5 h in Puffer mit 4 nM [3H]Biotin bei 37 °C inkubiert. Durch Filtration wurden die Zellen von ungebundenem Biotin getrennt und die mit den Zellen an den Filtern assoziierte Radioaktivität wurde per Flüssigkeitszintillationszählung gemessen. Die Biotinakkumulation durch einen Stamm mit Leervektor ergab einen Hintergrundwert von $0,8 \pm 0,2$ pmol Biotin/mg Protein. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen. **B)** Nachweis von BioY-Proteinen mittels Western-Blot gegen das C-terminale FLAG-Epitop nach elektrophoretischer Auftrennung von BioY aus solubilisierten Membranen. **C)** Rekombinante *E. coli* $\Delta bioH \Delta yigM::km$ -Derivate aus einer Vorkultur mit Ampicillin und 1 μ M Biotin wurden dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen und in Minimalmedium ohne Biotin bis zum Erreichen der maximalen Enddichte für ca. 24 h weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 nM Biotin und 0,5 mM IPTG auf eine vergleichbare Zelldichte ($OD_{578} \approx 0,05$) gebracht und das Wachstum wurde über etwa 24 h in Mikrotiterplatten verfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte der maximal erreichten OD_{600} dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichungen. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2013).

2.2 Strukturmodell des Biotintransporters BioM₂NY aus *R. capsulatus*

Der in der Einleitung beschriebene Mechanismus kippender und sich wieder aufrichtender S-Einheiten, der nach den ersten Kristallstrukturen von ECF-Transportern der Subklasse II postuliert worden war, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit rein hypothetisch. Die Charakterisierung von Teilschritten des Biotintransports durch BioM₂NY aus *R. capsulatus*

sollte einerseits die Richtigkeit des Kippmechanismus generell hinterfragen und andererseits die Gültigkeit auch für ECF-Transporter der Subklasse I überprüfen. Mangels Verfügbarkeit einer experimentell ermittelten dreidimensionalen Struktur wurde zur Darstellung der Topologie und Interaktionen der einzelnen Untereinheiten ein Strukturmodell von BioM₂NY mithilfe des Modellierungsservers SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014) erstellt. Als Matrize für das ECF-Modul aus homodimerem BioM₂ und der T-Komponente BioN diente die Kristallstruktur des Folattransporters aus *Lactobacillus brevis* (LbEcfA1A2T-FolT; pdb-Code: 4HUQ) (Xu et al., 2013). Für BioY diente die Kristallstruktur des BioY-Proteins aus *Lactococcus lactis* (pdb-Code: 4DVE) (Berntsson et al., 2012) als Matrize. Alternative Strukturmodelle wurden zunächst mit dem I-TASSER-Server (Yang et al., 2015) erstellt. Zur Beurteilung der Qualität wurden alle modellierten Strukturen mithilfe des DALI-Algorithmus (Holm und Laakso, 2016) mit ihren Vorlagen verglichen. Die durch SWISS-MODEL berechneten Strukturen zeigten dabei mit *root mean square deviations* (RMSDs) von 0,8 Å für BioM1 (für 220 von 284 C α -Atomen im Vergleich mit 4HUQ.A), 0,5 Å für BioM2 (im Vergleich mit 4HUQ.B für 223 von 275 C α -Atomen), 0,6 Å für BioN (verglichen mit 4HUQ.T für 204 von 245 C α -Atomen) und 0,4 Å für BioY (verglichen mit 4DVE.B für 177 von 188 C α -Atomen) die größten Ähnlichkeiten zwischen Matrize und Modell. Eine weitergehende Qualitätsbeurteilung dieser Modelle erfolgte mithilfe von PROCHECK (Laskowski et al., 1993), ProSA (Wiederstein und Sippl, 2007) und VERIFY3D (Eisenberg et al., 1997), welche allesamt die Kompatibilität eines Modells mit seiner eigenen Aminosäuresequenz untersuchen. Der durch den ProSA-Server ermittelte *Z-score* beschreibt die mittlere energetische Abweichung eines Ensembles von Fehlfaltungen relativ zur gegebenen Struktur und wird in der Einheit der Standardabweichung des Ensembles angegeben. Entscheidend für die Qualitätsbeurteilung ist, ob die *Z-scores* von Modell und Matrize vergleichbar sind und darüber hinaus in einer ähnlichen Größenordnung liegen wie die *Z-scores* von Proteinen mit bekannter Struktur und ähnlicher Größe. Dies war für die genannten Modelle und deren Matrizen der Fall (-6,3 für BioM1, -6,27 für BioM2, -2,55 für BioN, -4,2 für BioY, -8,93 für EcfA1 (4HUQ.A), -8,08 für EcfA2 (4HUQ.B), -3,76 für EcfT (4HUQ.T) und -3,87 für L/BioY (4DVE.B)). Auch die durch PROCHECK erstellten Ramachandran-Plots und die mithilfe von VERIFY3D generierten 3D-1D-Werte (nicht gezeigt) konnten die Güte der Modellierung bestätigen. Bei beiden Methoden erfolgt eine Beurteilung lokaler Strukturparameter wie Torsionswinkel und Orientierung von Seitenketten. Die Modelle der einzelnen Transporter-Untereinheiten wurden schließlich mit UCSF CHIMERA (Pettersen et al., 2004) zu dem in Abb. 12 dargestellten Strukturmodell zusammengefügt. Da das BioM₂-

Homodimer und BioN nach den entsprechenden Untereinheiten derselben Kristallstruktur modelliert wurden, konnten die Teilmodelle folglich nach den gleichen Raumkoordinaten wie in der Template-Struktur zusammengefügt werden. Die Interaktionsbereiche von BioY und BioN wurden dagegen mithilfe des ZDOCK-Servers bestimmt (Pierce et al., 2014) und die Lage von BioY an der Position von *LbFolT* in *LbEcfa1A2T-FolT* (pdb-Code 4HUQ) orientiert.

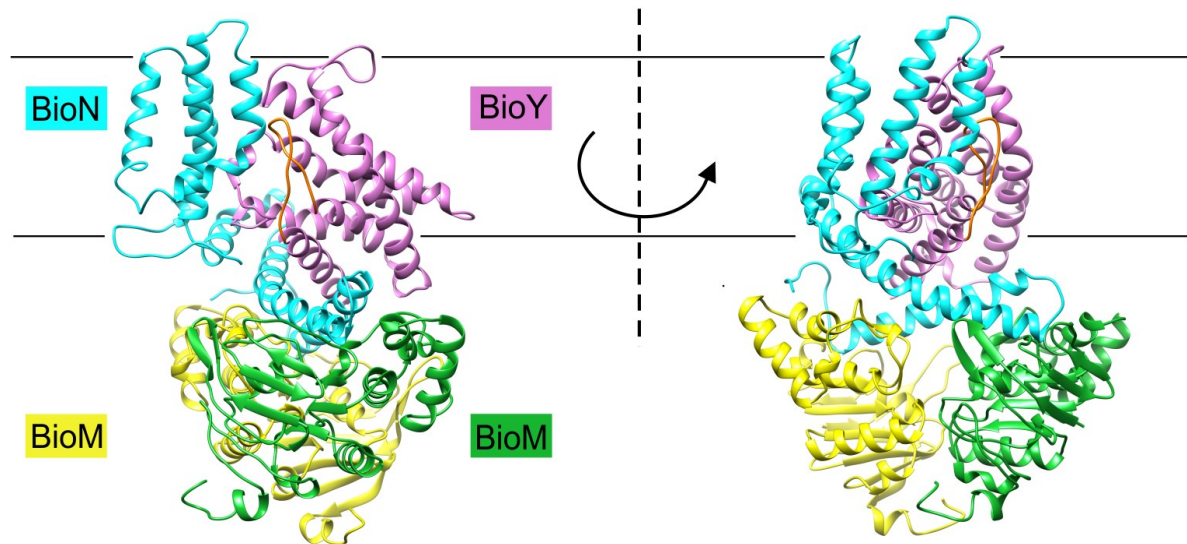


Abb. 12: Strukturmodell von BioM₂NY aus *R. capsulatus*. Die einzelnen Untereinheiten wurden mit SWISS-MODEL modelliert und in UCSF CHIMERA zu einem Strukturmodell des Holotransporters zusammengesetzt. Als Matrize für das ECF-Modul (*RcBioM₂N*) diente die Kristallstruktur eines ECF-Transporters aus *L. brevis* (pdb-Code: 4HUQ) und für *RcBioY* die Struktur des BioY-Proteins aus *L. lactis* (pdb-Code: 4DVE).

In den Holotransporter-Strukturen, die zum Zeitpunkt der Arbeit bekannt waren, sind die S-Einheiten nahezu senkrecht zur T-Einheit angeordnet, was beinahe einer horizontalen Orientierung in der Membran entspricht. Auch BioY nimmt im Modell von BioM₂NY eine vergleichbare, liegende Topologie ein. Der *Loop* 1 der S-Einheiten, der die ersten beiden transmembranen Helices verbindet und die Substratbindestellen verschließen kann, ist in den Kristallstrukturen der Holotransporter jeweils von der Bindetasche weggeklappt und zeigt ins Zytosol. Das korreliert mit der Tatsache, dass keine Elektronendichten für Substrate erkennbar, die S-Einheiten also substratfrei waren (Wang et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014). In den einzeln kristallisierten S-Einheiten RibU (Karpowich et al., 2016; Zhang et al., 2010), ThiT (Erkens et al., 2011), FolT (Zhao et al., 2015) und BioY aus *L. lactis* (Berntsson et al., 2012), für welche eine aufrechte Topologie in der Membran angenommen wird, ist der *Loop* 1 dagegen nach außen gerichtet und auf die Substratbindestelle geklappt. Dabei ist er an der Koordination der jeweiligen Substrate beteiligt und die beladene Bindetasche ist damit

geschlossen. Da *RcBioY* nach der Struktur des solitär kristallisierten BioY-Proteins aus *L. lactis* (mit geschlossener Bindetasche) modelliert wurde, liegt der *Loop* 1 von *RcBioY* im BioM₂NY-Modell (orange in Abb. 12) in einer „geschlossenen“ Konformation vor und entspricht damit vermutlich nicht der korrekten Orientierung im Holotransporter. Generell belegen die niedrigen RMSDs und die *Z-scores* der Modelle und Matrizen jedoch eine große Übereinstimmung des BioM₂NY-Modells mit den jeweiligen experimentell bestimmten Strukturen. Die gute Modellierbarkeit des Subklasse I-Transporters BioM₂NY nach dem Subklasse II-Transporter *LbEcfA1A2T-FolT* kann als Hinweis auf eine ähnliche strukturelle Organisation und Funktionsweise der ECF-Transporter angesehen werden.

2.3 Analyse der Substratbeladung von BioM₂NY mithilfe LC-gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS)

Mithilfe von LC-gekoppelter Massenspektrometrie wurde überprüft, ob der aus Membranen isolierte Biotintransporter BioM₂NY wie die kristallisierten ECF-Transporter *LbEcfA1A2T-FolT* bzw. *RibU* bzw. *PdxU* aus *L. brevis* substratfrei und damit ebenfalls im sogenannten *Resting State* vorliegt. In früheren Arbeiten wurde eine Methode etabliert, die die Quantifizierung des Biotin-Gehalts isolierter BioY-Proteine mittels LC-MS ermöglicht (Kirsch et al., 2012). Dieses Verfahren wurde nun auf BioM₂NY-Komplexe angewendet. Die massenspektrometrische Untersuchung isolierter wildtypischer BioM₂NY-Komplexe zeigte tatsächlich keine nachweisbaren Mengen an gebundenem Biotin ($2 \pm 0,06$ pmol pro 500 pmol Protein). Für solitäres BioY konnte dagegen die von Kirsch et al. gemessene Biotinbeladung von etwa 50 % (262 ± 28 pmol Biotin pro 500 pmol BioY) bestätigt werden. Das Vorliegen des Komplexes in einem substratfreien Zustand ist ein weiterer Hinweis auf eine grundsätzliche Ähnlichkeit der ECF-Transporter der Subklassen I und II und zeigt, dass gereinigtes BioM₂NY für eine Untersuchung der Substratbeladung geeignet ist. Da die Substratbindestelle im isolierten Komplex offenbar unbeladen ist, untermauert dies die Vermutung, dass der im BioM₂NY-Modell in geschlossener Konformation gezeigte *Loop* 1 von *RcBioY* zum Zytosol geöffnet sein müsste.

2.4 Funktionelle Rekonstitution und Charakterisierung des Biotintransporters BioM₂NY in Nanodiscs

Durch den fehlenden Lateraldruck der natürlichen Membran verändern Membranproteine oder Membranproteinkomplexe in Detergenzlösung oft ihre natürlichen Eigenschaften. Um den gereinigten BioM₂NY-Transporter unter Bedingungen zu analysieren, die seiner natürlichen Umgebung möglichst nahe kommen, wurde daher ein künstliches Membransystem benötigt. Da sich die Rekonstitution des Biotintransporters in Liposomen in früheren Arbeiten als nicht effektiv erwiesen hatte (Alfandega, 2008), wurde das Nanodisc-System gewählt. Nanodiscs ermöglichen eine Rekonstitution von Membranproteinen in einer künstlichen Phospholipid-Scheibe mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern, die durch zwei Kopien eines amphipathischen Gürtelproteins (MSP, *membrane scaffold protein*) umschlossen und in Lösung gehalten wird (Bayburt und Sligar, 2010). Isolierte BioM₂NY-Komplexe wurden mit dem Gürtelprotein und *E. coli*-Lipiden im Verhältnis von 1:5:1200 vermischt und durch steten Entzug von Detergenz zur Rekonstitution gezwungen (vgl. Abschnitt 4.20). Isoliertes Gürtelprotein wurde freundlicherweise für die gesamten Arbeiten von H. Landmesser aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Schneider zur Verfügung gestellt. Abb. 13A zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten Komponenten solubilisierter BioM₂NY enthaltender Nanodiscs mit dem MSP-Derivat MSP1E3D1. Per Pixelanalyse wurde die Intensität der Proteinbanden von BioM₂NY und des Gürtelproteins quantifiziert, um eine Aussage über die Stöchiometrie des Transporters in den Nanodiscs treffen zu können. Da pro Nanodisc stets zwei Gürtelproteine und im Transporter-Komplex zwei ATPasen (BioM₂) vorliegen (s. Abschnitt 2.2), wurde die vergleichbare Bandenintensität von MSP und BioM mit einem stöchiometrischen Verhältnis von einem Biotintransporter pro Nanodisc gedeutet (2MSP:2BioM:1BioN:1BioY). In der Vergangenheit waren jedoch Oligomerformen von BioM₂NY und seinen Komponenten beobachtet worden (Finkenwirth et al., 2010; Hebbeln et al., 2007; Neubauer et al., 2011) und daher sollte ausgeschlossen werden, dass die Größe der Nanodiscs die Rekonstitution potentieller Transporter-Oligomere verhinderte. Die Verwendung der MSP-Derivate MSP1 und MSP2, die zu Discs mit kleinerem bzw. größerem Durchmesser führten (Grinkova et al., 2010), hatten jedoch keinen merklichen Effekt auf die stöchiometrische Zusammensetzung der Nanodiscs (s. Anhang, Abb. 36). Da MSP1E3D1 die höchste Ausbeute erzielte, wurde mit diesem Gürtelprotein weiter gearbeitet.

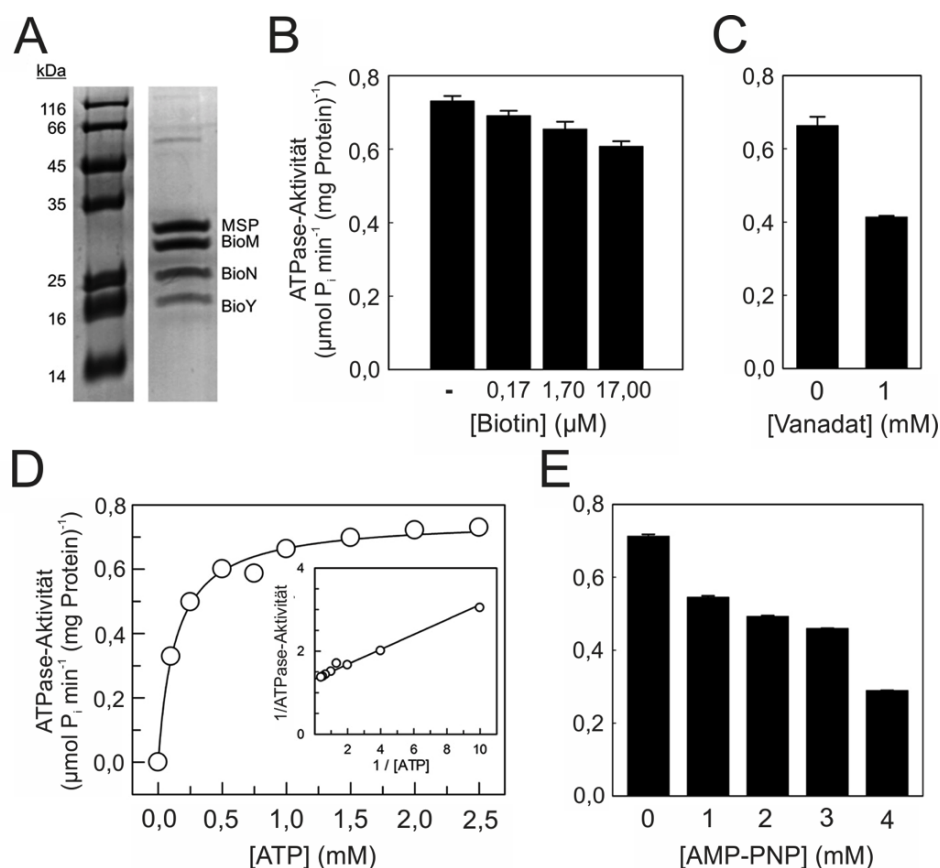


Abb. 13: ATPase-Aktivität des in Nanodiscs rekonstituierten Transporter-Komplexes BioM₂NY. **A)** Gezeigt sind 1,5 μg BioM₂NY nach der elektrophoretischen Auftrennung und Coomassie-Färbung solubilisierter Nanodiscs. Verwendet wurde ein 16%es Tricin-Gel. **D)** Kinetik der ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration mit integriertem Lineweaver-Burk-Plot. Die Konzentration von MgCl_2 betrug überall 3 mM. **B, C, E)** Einfluss von Biotin, Vanadat und AMP-PNP auf die ATPase-Aktivität von 0,9 μM BioM₂NY in Nanodiscs. Alle Messungen wurden in drei oder vier unabhängigen Wiederholungen durchgeführt, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Datenanalyse erfolgte mit GRAFIT. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2015).

Zur Bestätigung der Funktionalität des rekonstituierten Transporter-Komplexes wurde in Zusammenarbeit mit H. Landmesser und Prof. Dr. E. Schneider seine ATPase-Aktivität bestimmt. Verglichen mit seiner typischen Aktivität in Detergenzlösung ($0,53 \pm 0,04 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Neubauer *et al.*, 2011)) zeigte der Komplex in Nanodiscs mit $0,73 \pm 0,01 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ eine deutlich erhöhte ATPase-Aktivität, welche durch die Anwesenheit von Biotin leicht inhibiert wurde (Abb. 13B). Die kinetische Analyse der ATP-Umsetzung (Abb. 13D) ergab eine maximale Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) von $0,76 \pm 0,02 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mit einer Umsatzrate (k_{cat}) von $1,27 \text{ s}^{-1}$ und eine Michaelis-Konstante (K_{m}) von $0,14 \pm 0,02 \text{ mM}$. Die Zugabe des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons AMP-PNP (Hopfner *et al.*, 2000) führte bei einer Konzentration von 4 mM und 2 mM ATP zu einer Hemmung der ATPase-Aktivität

von etwas über 50 % (Abb. 13E). Die kinetische Analyse der ATPase-Aktivität bei 4 mM AMP-PNP (Messwerte nicht gezeigt) ergab eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von $0,51 \pm 0,026 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und eine Michaelis-Konstante K_m von $0,72 \pm 0,02 \text{ mM}$, was auf eine Wirkung von AMP-PNP als kompetitiver Inhibitor hindeutete. Weiterhin wurde der Effekt von Vanadat untersucht, welches bei mehreren kanonischen ABC-Transportern zum Festhalten des posthydrolytischen, ADP-gebundenen Zustands nach einem Katalyse-Teilzyklus verwendet wurde (Chen et al., 2001; Oldham und Chen, 2011; Urbatsch et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte mit 1 mM Vanadat eine Hemmung der ATPase-Aktivität von etwa 44% beobachtet werden (Abb. 13C), was verglichen mit den untersuchten kanonischen ABC-ATPasen eine hohe Restaktivität darstellt.

Für die ortspezifische Proteinmarkierung mit thiol-spezifischen Reagenzien und für Quervernetzungen über Disulfidbrücken wurden einzelne Cysteinreste oder Kombinationen von Cysteinresten an spezifischen Positionen in den Transporter eingefügt. Voraussetzung hierfür war eine cysteinfreie Variante von BioM₂NY, die in vorangegangenen Arbeiten hergestellt und charakterisiert worden war (Neubauer et al., 2011). In Detergenzlösung besaß der cysteinfreie BioM₂NY-Komplex eine ATPase-Aktivität von $0,17 \pm 0,03 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Neubauer et al., 2011). Nach Einbau in Nanodiscs zeigte diese Variante mit $0,43 \pm 0,015 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ etwa 60 % der wildtypischen Aktivität, weshalb das Nanodisc-System für funktionelle Untersuchungen an BioM₂NY gut geeignet war.

2.5 Schließen und Öffnen des BioM-Dimers als Folge der ATP-Bindung und -Hydrolyse

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die Funktionalität des Biotintransporters in Nanodiscs bezüglich seiner ATPase-Aktivität gezeigt wurde, sollte im Folgenden die damit einhergehende strukturelle Reorientierung des ATPase-Dimers charakterisiert werden. Die aus zwei Nukleotidbindedomänen (NBDs) bestehenden ABC-Module kanonischer ABC-Transporter und des Doppelstrangbruch-Reparatursystems Rad50 vollziehen nach Bindung zweier ATP-Moleküle eine pinzettenartige Schließbewegung (Hopfner et al., 2000; Moody et al., 2002; Smith et al., 2002). Um ein nukleotidabhängiges Schließen des ATPase-Dimers von BioM₂NY untersuchen zu können, wurden gezielt Cystein-Codons in *bioM* eingefügt. Die resultierenden Positionen der Cysteinreste im Interaktionsbereich des Dimers sind in Abb. 14B gezeigt. Durch chemische Quervernetzung der beiden Thiolgruppen im BioM-Homodimer mit

D86C- bzw. Q88C-Austauschen sollte der Abstand zwischen den beiden Untereinheiten charakterisiert werden. Die gewählten Aminosäurereste liegen in der sogenannten Q-Helix, einem charakteristischen Motiv von ECF-ATPasen (Karpowich und Wang, 2013), welches dem *Q-Loop* der NBDs kanonischer ABC-Transporter entspricht. Der *Q-Loop* spielt dort eine entscheidende Rolle bei der Interaktion der NBDs mit den Transmembrandomänen (TMDs) und eine vergleichbare Bedeutung wurde für die Q-Helix postuliert (Karpowich und Wang, 2013). In Abschnitt 2.12 wird die Rolle der Q-Helix für den Mechanismus des Biotintransporters BioM₂NY näher beleuchtet. Die D86C- und Q88C-Varianten hatten in Nanodiscs eine ATPase-Aktivität von $0,53 \pm 0,12 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,87 \pm 0,2 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, was 73 % bzw. sogar 119 % der wildtypischen Aktivität entsprach. Beide Doppelcysteinvarianten wurden in Zusammenarbeit mit H. Landmesser (AG Prof. Dr. E. Schneider) mit den längenspezifischen homobifunktionalen Quervernetzern 1,2-Ethandiyl-bis-Methanthiosulfonat (EBS) und 1,6-Hexandiyl-bis-Methanthiosulfonat (HBS) (Loo und Clarke, 2001) behandelt und mittels SDS-PAGE auf die Entstehung von Vernetzungsprodukten untersucht (Abb. 14A). Der Abstand zweier mit EBS und HBS vernetzbarer Thiolgruppen beträgt maximal 5 Å bzw. 10 Å. Beide Varianten zeigten im ATP-freien Zustand sowohl mit EBS als auch mit HBS eine dem BioM-Dimer entsprechende Proteinbande. Die Laufhöhe des BioM-Dimers im SDS-Gel wurde bereits in früheren Arbeiten von Olivia Neubauer per Western-Blot mit Antikörpern gegen das N-terminale His-Tag an BioM identifiziert (Neubauer et al., 2011). Unter Anwesenheit von ATP konnte bei BioM₂NY mit dimerem BioM_[D86C] eine Zunahme des EBS-induzierten Quervernetzungsproduktes (1,7-fach nach Pixelanalyse) beobachtet werden. Bei Q88C war durch ATP eine noch deutlichere Verstärkung der BioM-Vernetzung (2,6-fach für EBS, 3,4-fach für HBS) zu beobachten. Die offensichtliche Häufung kurzer Abstände von 5-10 Å deutete auf eine ATP-induzierte Annäherung der BioM-Untereinheiten hin.

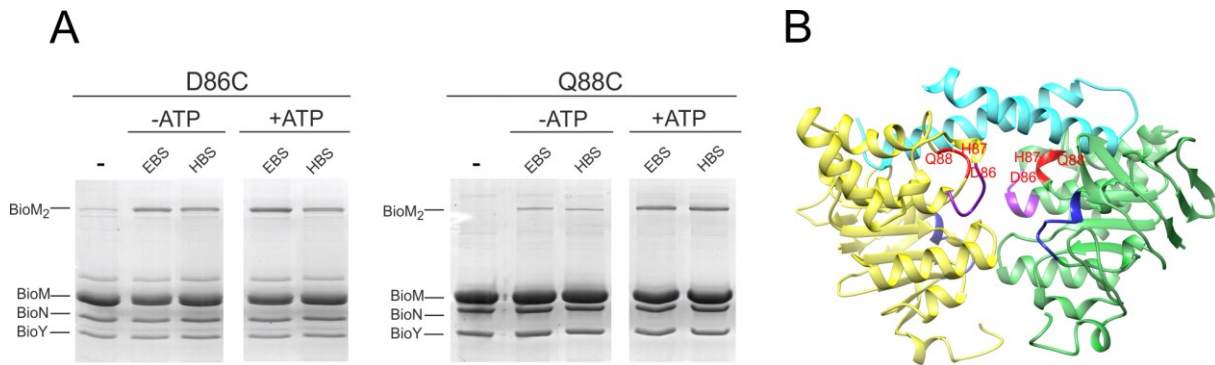


Abb. 14: Längenspezifische Quervernetzung des BioM-Dimers in Ab- und Anwesenheit von ATP. A) Dargestellt sind per SDS-PAGE aufgetrennte und mit Coomassie gefärbte BioM₂NY-Varianten mit D86C- oder Q88C-Austauschen in BioM nach Behandlung mit 4 mM EBS bzw. HBS. Vor der Vernetzung wurden die Proben mit 2 mM DTT reduziert, um die spontane Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern, und optional mit 2 mM ATP inkubiert. Reaktionsstopp erfolgte mit 5 mM N-Ethylmaleimid (NEM) nach 20 min. **B)** Ausschnitt des BioM₂NY-Modells mit Darstellung der Positionen 86, 87 und 88 (rot), sowie der Walker A- (dunkelblau) und der Signaturmotive (lila) der beiden BioM-Untereinheiten. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2015).

Eine genauere Quantifizierung der Abstandsänderung wurde mithilfe von gepulster ESR-Spektroskopie (DEER) in Zusammenarbeit mit M. Sippach und Prof. Dr. H.-J. Steinhoff (Universität Osnabrück) erzielt. Die Analyse der Elektronenspinkopplung zweier an Thiolgruppen gebundener Nitroxidmoleküle lässt eine detaillierte Abstandsmessung im Bereich von 15 bis 60 Å zu (Jeschke, 2012). Eine effiziente Markierung mit dem Methanthiosulfonat-Spinlabel (MTSSL) war an Position 88 jedoch nicht möglich und die Markierung an Position 86 führte zu Spin-Überlappungen, die eine Abstandsanalyse unmöglich machten (Daten nicht gezeigt). Eine Rotameranalyse (Polyhach *et al.*, 2011), die die Anzahl der sterisch möglichen Rotamer-Orientierungen des Spinlabels MTSSL an einer gegebenen Position anhand lokaler Strukturinformationen berechnet, deutete hingegen auf eine gute Markierbarkeit an der Position 87 (s. Abb. 14B) hin. Da ein Cysteinaustausch an dieser Position keinen merklichen Einfluss auf die ATPase-Aktivität hatte ($0,51 \pm 0,13 \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), war diese Position gut für die Abstandsmessung geeignet. Abb. 15 zeigt die DEER-Rohdaten $V(t)$, den Formfaktor $F(t)$ nach Abzug des Hintergrundes $B(t)$ und die daraus resultierende Abstandverteilung $P(d)$ bei einer Modulationstiefe von 8-12%. Im Apo-Zustand konnte ein Spin-Spin-Abstand von 3,4 nm ermittelt werden, der sich nach Bindung von ATP oder AMP-PNP auf 2,7 nm verringerte. Im posthydrolytischen Zustand, der durch ATP-Hydrolyse nach vorheriger ATP-Beladung oder Inkubation mit MgADP erreicht wurde, vergrößerte sich der Abstand auf 3,9 nm. Diese Daten belegten das Schließen und Öffnen des BioM-Dimers im ATP-Hydrolysezyklus und zeigten,

dass dieser dynamische Prozess an rekonstituierten BioM₂NY-Komplexen im Nanodisc-System verfolgt werden kann.

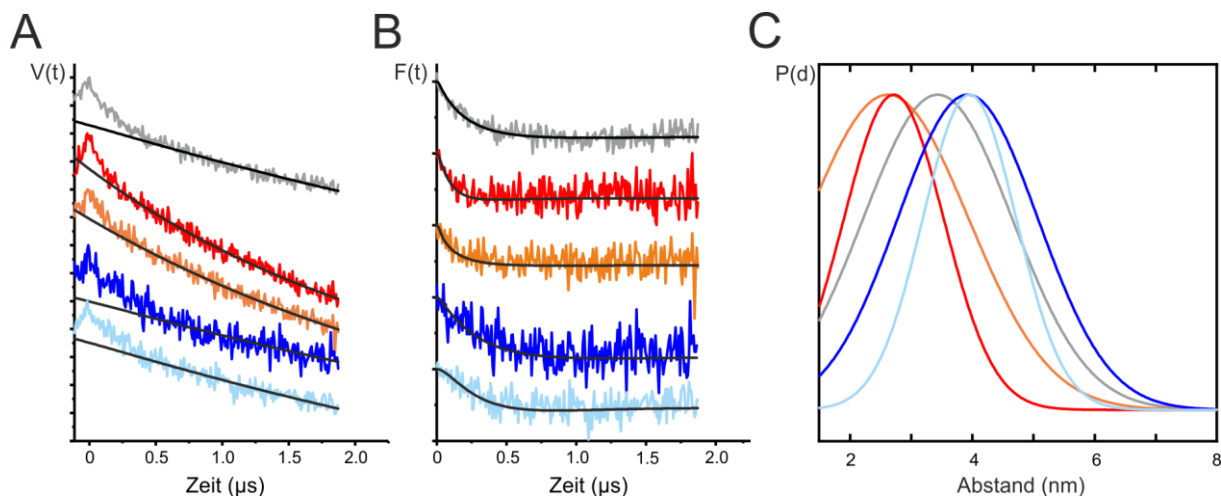


Abb. 15: DEER-Spektren und resultierende Abstandsverteilung für BioM₂NY mit BioM_[H87C]. Der gereinigte Transporter-Komplex wurde in Nanodiscs rekonstituiert, spinmarkiert und bei einer Konzentration von etwa 50 μ M analysiert. Die Markierungseffizienz lag bei etwa 0,35-0,5 %. Dargestellt sind die DEER-Rohdaten $V(t)$ (A) sowie der Formfaktor $F(t)$ nach Abzug des Hintergrunds $B(t)$ (B) und die daraus mithilfe eines Gauß-Fit abgeleitete Abstandsverteilung $P(d)$ (C) für den ATP-freien (grau), den Adenosintriphosphat-gebundenen (ATP mit EDTA, rot bzw. AMP-PNP mit Mg^{2+} , orange) sowie den posthydrolytischen Zustand (herbeigeführt durch ATP mit Mg^{2+} , blau bzw. mit ADP und Mg^{2+} , hellblau). Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2015).

2.6 Identifikation eines Interaktionsmotivs in BioY

Die Kopplung von Substrattransport und ATP-Hydrolyse in ABC-Transportern setzt eine Übertragung der ATP-abhängigen Konformationsänderungen des ATPase-Dimers an die anderen Komponenten, die die Substrattranslokation vermitteln, voraus. Kanonische ABC-Importer besitzen in ihren Transmembrandomänen (TMDs) mit dem sogenannten EAA-Loop ein konserviertes Motiv, das eine Schlüsselrolle bei der Interaktion mit den NBDs spielt (Davidson *et al.*, 2008). Die Übertragung des ATP-abhängigen Schließens und Öffnens der NBDs auf die TMDs ermöglicht letztlich die Substrattranslokation durch den Transportkanal des TMD-Dimers. In den Kopplungshelices der T-Einheit von BioM₂NY aus *R. capsulatus* und dem Subklasse II - ECF-Transporter aus *L. mesenteroides* waren in früheren Arbeiten zwei hoch konservierte Arginin-Motive entdeckt worden, die für die Interaktion der T-Komponente mit den ECF-ATPasen essentiell sind (Neubauer *et al.*, 2009). Mithilfe von Quervernetzungsexperimenten wurde der Interaktionsbereich von *RcBioM* und *RcBioN*

charakterisiert und gezeigt, dass die Arginin-Motive höchstwahrscheinlich mit einer sauren Tasche der helikalen Domäne von *RcBioM* interagieren (Neubauer et al., 2011). Diese Interaktionen wurden später über die Kristallstrukturen der ECF-Transporter aus *L. brevis* strukturell belegt (Zhang, 2013).

Um ein Substrat über die Membran zu transportieren, müssen die auf die T-Einheit übertragenen Konformationsänderungen an die S-Einheiten weitergegeben werden. S-Einheiten von ECF-Transportern der Subklasse II besitzen in der ersten Transmembranhelix ein konserviertes Motiv, in dem zwei kleine, hydrophobe Aminosäurereste (häufig Ala-Reste) durch drei dazwischen liegende beliebige Reste getrennt sind. Dieses AxxxA-Motiv spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion der S-Einheit mit der T-Komponente. Bei den thiamin- bzw. pantothenatspezifischen Transportern EcfA1A2T-ThiT aus *L. lactis* (Erkens et al., 2011) und EcfA1A2T-PanT aus *L. brevis* (Zhang et al., 2014) hatten einzelne Austausche der Alanine gegen Tryptophan während der Reinigung über die His-getaggte A1- bzw. T-Komponente zu einem Verlust der S-Einheit geführt. Im Rahmen einer Bachelorarbeit war auch in TMH1 von *RcBioY* ein vergleichbares Motiv mit der Sequenz A₁₂A₁₃xxV₁₆A₁₇ identifiziert worden (Kiesler, 2013). Ein Austausch von Ala-12 oder Ala-13 gegen die große hydrophobe Aminosäure Tryptophan und insbesondere der Doppelaustausch von Ala-13 und Ala-17 hatten einen starken Verlust der Komplexstabilität zur Folge. Auch in den BioY-Proteinen zweier weiterer ECF-Transporter der Subklasse-I für Biotin aus *Agrobacterium tumefaciens* und *Sinorhizobium meliloti* wurden mithilfe eines Sequenzvergleiches mit *RcBioY* entsprechende Aminosäuren (A₁₇xxxA₂₁ bei *AtBioY* und A₁₄xxxV₁₈ bei *SmBioY*) identifiziert (s. Abb. 16).



Abb. 16: Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen von *AtBioY*, *SmBioY* und *RcBioY*. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Clustal Omega-Algorithmus (Sievers et al., 2011) durchgeführt. Hydrophobe Aminosäuren des mutmaßlichen Interaktionsmotivs in der TMH1 sind rot umrahmt.

Tryptophanreste anstelle von Ala-17 bei *AtBioY* (Abb. 17A) sowie anstelle von Ala-14 und Val-18 bei *SmBioY* führten zu einer signifikanten Komplexdestabilisierung (Abb. 17B). Nach Reinigung der entsprechenden Transporter-Varianten über das His-Tag an BioM war im Gegensatz zu den wildtypischen Komplexen BioY im SDS-Gel und Western-Blot nicht erkennbar. Bei *AtBioMNY* traten langsamer wandernde Laufformen von BioY auf, die als

Dimer interpretiert wurden. BioY-Oligomere waren bereits in früheren Arbeiten *in vivo* (Finkenwirth et al., 2010; Hebbeln et al., 2007) und *in vitro* (Fisher et al., 2012; Kirsch et al., 2012) beobachtet worden.

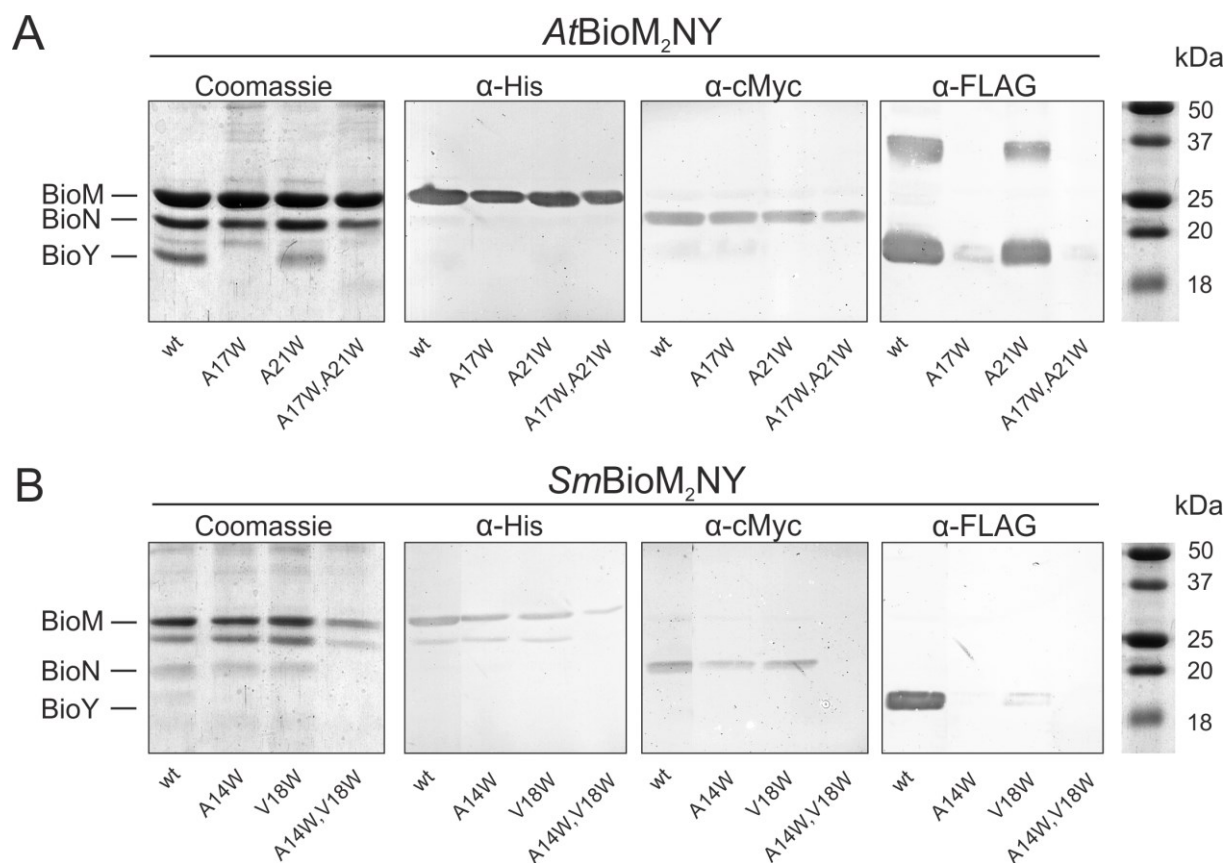


Abb. 17: Funktion des AxxxA/V-Motivs in BioM₂NY von *A. tumefaciens* und *S. meliloti*. SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse der BioM₂NY-Komplexe von *A. tumefaciens* (A) und *S. meliloti* (B) mit Aminosäureaustauschen an Position 17/21 in AtBioY bzw. 14/18 in SmBioY. 3 µg Protein wurden im SDS-Gel aufgetrennt, per Semi-Dry-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen das His-Tag an BioM, das cMyc-Tag an BioN oder das FLAG-Tag an BioY detektiert.

2.7 Analyse der Transportfunktion veränderter BioM₂NY-Varianten

Um Aussagen über die Transportaktivität der veränderten Biotintransporter aus *R. capsulatus*, *A. tumefaciens* und *S. meliloti* treffen zu können, wurde das Wachstum des biotinauxotrophen Indikatorstammes (vgl. Abschnitt 2.1) nach Produktion der jeweiligen Transporter-Varianten unter Biotinmangel (1 nM) analysiert. War der Stamm in der Lage, mit 1 nM Biotin zu wachsen, konnte auf eine Funktionstüchtigkeit geschlossen werden. Wie in Abb. 18 dargestellt, erwiesen

sich die BioM₂NY-Komplexe aus *A. tumefaciens* und *S. meliloti* wie BioM₂NY aus *R. capsulatus* als hoch-affine Biotintransporter. In Abschnitt 2.1.3 war gezeigt worden, dass einige solitäre BioY-Proteine ohne A- und T-Komponenten eine Transportaktivität besitzen. Die in der Vergangenheit diskutierte Aktivität von solitärem RcBioY (Hebbeln et al., 2007) ließ sich jedoch mithilfe des Indikatorstammes nicht bestätigen. Ohne BioM₂N waren weder RcBioY noch die anderen beiden BioY-Proteine (*AtBioY*, *SmBioY*) in der Lage, Biotin in für das Wachstum ausreichenden Mengen in die Zellen zu befördern. Da die Transportfunktion unter diesen Untersuchungsbedingungen offensichtlich vom Komplex des Holotransporters BioM₂NY abhing, bot der Stamm ein geeignetes Instrument, um funktionelle Auswirkungen von Aminosäureaustauschen, die die Interaktion von BioN und BioY beeinträchtigten, zu analysieren.

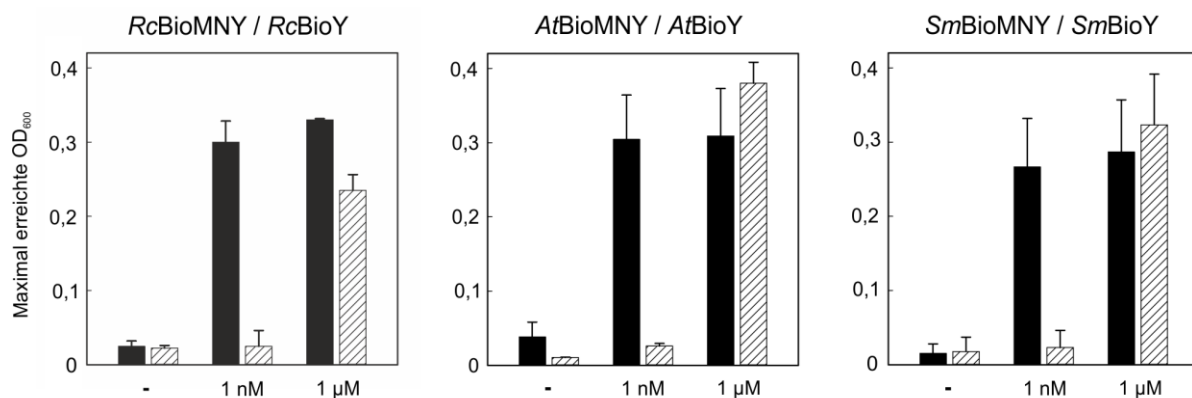


Abb. 18: Darstellung des biotinabhängigen Wachstums der *bioH/yigM*-Doppelmutante unter Produktion von BioM₂NY (schwarz) und BioY (schraffiert) aus *R. capsulatus*, *A. tumefaciens* und *S. meliloti*. Zellen einer in Minimalmedium mit 1 μM Biotin und Ampicillin angezogenen Vorkultur wurden dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen, ohne Biotin bis zum Erreichen des maximalen Wachstums weiter inkubiert, schließlich in Minimalmedium ohne bzw. mit 1 nM oder 1 μM Biotin und 0,5 mM IPTG auf eine vergleichbare Ausgangszelldichte gebracht und das Wachstum analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweils maximal erreichten Zelldichte aus drei unabhängigen Experimenten in Mikrotiterplatten.

In allen drei BioM₂NY-Komplexen hatte ein Austausch des ersten Alanins in dem Interaktionsmotiv in BioY gegen Tryptophan zu einer deutlichen Schwächung der Interaktion mit BioM₂N und damit zum Zerfall des Holotransporters während der Isolation aus Membranen geführt. Daher war anzunehmen, dass diese Aminosäureaustausche einen Funktionsverlust des Transporters bewirken würden. Tatsächlich hatte ein Tryptophanaustausch an den Positionen 12 und 13 in RcBioY einen deutlichen Funktionsverlust des Holotransporters zur Folge, denn

Wachstum des Stammes war mit 1 nM Biotin nicht mehr möglich (Abb. 19). An Position 16 schien der Austausch gegen Tryptophan lediglich eine etwas geschwächte Funktion zu bewirken. Das Einfügen der Aminosäure Valin an diesen Positionen hatte dagegen keinen nennenswerten Effekt auf die Funktion, was die Bedeutung der kleinen hydrophoben Aminosäuren in diesem Bereich unterstützt. Bei den Transportern aus *A. tumefaciens* und *S. meliloti* hatten Austausche gegen Tryptophan ebenfalls einen deutlichen Funktionsverlust zur Folge (Abb. 19). Die Produktion von *AtBioM₂NY*-Varianten mit Tryptophanaustauschen an Position 17 oder 21 in BioY führten zu einem deutlich verminderten Wachstum. Der gleichzeitige Austausch beider Reste bewirkte einen kompletten Funktionsverlust. Auch unter Produktion des Transporters aus *S. meliloti* mit einem Tryptophanaustausch an Position 14 in BioY konnte der Referenzstamm nicht mehr wachsen. An Position 18 schien ein eingefügter Tryptophanrest dagegen keinen nennenswerten Einfluss auf die Funktion zu haben. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass das Motiv in der ersten Helix von BioY in allen drei Transportern eine essentielle Rolle in der Untereinheiteninteraktion von BioN und BioY spielt, die für die funktionelle Wechselwirkung innerhalb des Transporters von entscheidender Bedeutung ist.

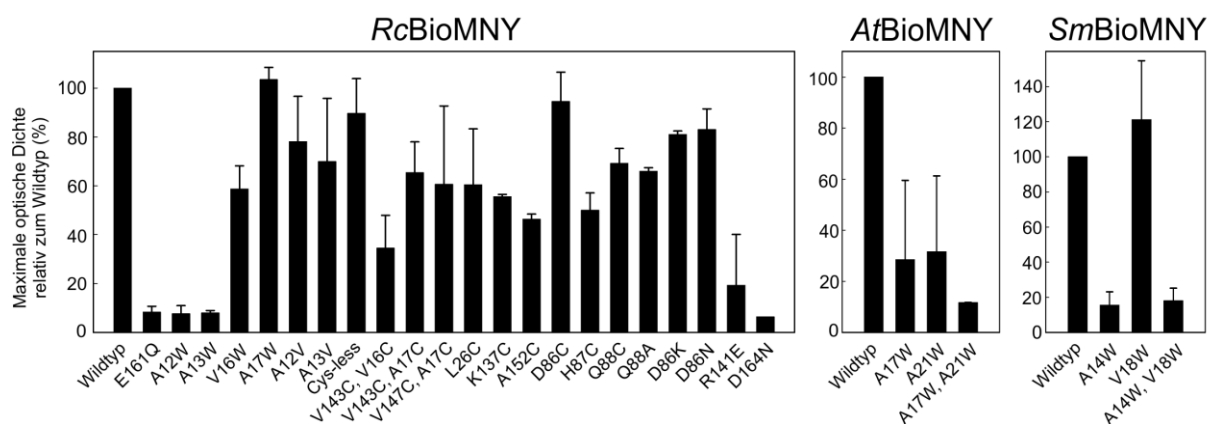


Abb. 19: Biotinabhängiges Wachstum der *bioH/yigM*-Doppelmutante unter Produktion verschiedener BioM₂NY-Varianten. Angegeben ist die jeweils maximal erreichte Zelldichte des Referenzstammes unter Produktion der modifizierten Transporter-Varianten relativ zum wildtypischen BioM₂NY aus *R. capsulatus*, *A. tumefaciens* und *S. meliloti*. Zellen einer Vorkultur in Minimalmedium mit Ampicillin und 1 μ M Biotin wurden dreimal in Phosphatpuffer gewaschen, bis zum Erreichen des maximalen Wachstums weiter inkubiert und anschließend unter Zugabe von 0,5 mM IPTG mit 1 nM Biotin auf eine vergleichbare Zellzahl gebracht. Die Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten in Mikrotiterplatten. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2015).

Neben den genannten Varianten mit Valin- und Tryptophanaustauschen wurden darüber hinaus alle anderen in dieser Arbeit hergestellten Varianten bezüglich ihrer Funktion getestet (Abb. 19). Dabei gab es bei keiner der Einzel- oder Doppelcysteinvarianten, die in späteren Teilen der Arbeit für Quervernetzungsexperimente oder zur Markierung von Thiolgruppen mit molekularen Sonden benötigt wurden, signifikante Einschränkungen. Auch die gänzlich cysteinfreie BioM₂NY-Variante (*Cys-less*) zeigte eine dem Wildtyp entsprechende Aktivität. Lediglich eine Variante, bei der durch einen Austausch des konservierten sauren Restes hinter dem Walker B-Motiv in BioM (BioM_{[E161Q]2}NY) die ATPasen inaktiviert wurden, zeigte keine Transportaktivität mehr. Bei kanonischen ABC-Transportern war gezeigt worden, dass diesem sogenannten katalytischen Carboxylat eine zentrale Rolle in der Aktivierung der ATP-Hydrolyse zukommt (Daus et al., 2007; Moody et al., 2002; Orelle et al., 2003). Wurde der Glutamatrest dort durch Glutamin ersetzt, konnte ATP zwar noch gebunden, jedoch nicht mehr hydrolysiert werden. Auch die Variante von RcBioM₂NY mit einem Glutaminaustausch an Position 161 in BioM war mit einer ATPase-Aktivität von $0,062 \pm 0,021 \text{ } \mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ inaktiv.

2.8 Ortsspezifische Quervernetzung von BioN und BioY

In den vorausgegangenen Abschnitten wurde die Bedeutung konservierter Aminosäuren in der TMH1 von BioY für die funktionelle Interaktion mit dem ECF-Modul (BioM₂N) herausgestellt. Abgeleitet von den bekannten Kristallstrukturen und dem in dieser Arbeit erstellten Strukturmodell von BioM₂NY (vgl. Abschnitt 2.2) wurden die Reste Val-143 und Val-147 in der zweiten Kopplungshelix (CH2) in BioN als mutmaßliche Interaktionspartner mit dem A₁₂A₁₃XXV₁₆A₁₇-Motiv in BioY identifiziert. Durch Einfügen einzelner Cysteine und die chemische Quervernetzung der Thiolgruppen sollten die räumliche Nähe dieser Positionen und die zyklusabhängige Dynamik dieses Interaktionsbereiches von BioN und BioY untersucht werden.

In früheren Arbeiten waren Homooligomere von BioN und BioY beobachtet worden (Finkenwirth et al., 2010; Kirsch et al., 2012; Neubauer et al., 2011). Es mussten daher zunächst isolierte Komplexe mit einzelnen Cysteinen in BioN oder BioY bzw. mit Cysteinen in beiden Komponenten vernetzt werden, um die entstehenden Proteinbanden den potentiell möglichen Hetero- und Homodimeren der Komponenten zuordnen zu können. Isolierte BioM₂NY-Komplexe wurden unbehandelt bzw. nach Oxidation durch Kupferphenantrolin (Cu-Phe) in

SDS-Probenpuffer ohne Reduktionsmittel denaturiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert (Abb. 20). So trat bei BioM₂NY_[A17C] eine langsam laufende Bande auf, die sich mit Antikörpern gegen das FLAG-Epitop, nicht aber mit solchen gegen das cMyc-Tag nachweisen ließ und damit als BioY-Dimer identifiziert werden konnte. Entsprechend wurden mithilfe eines Antikörpers gegen das cMyc-Tag an BioN bei BioM₂N_[V143C]Y bzw. mit Antikörpern gegen cMyc- und FLAG-Tag bei BioM₂N_[V143C]Y_[A17C] die Laufhöhen des BioN-Homodimers und des BioNY-Heterodimers identifiziert.

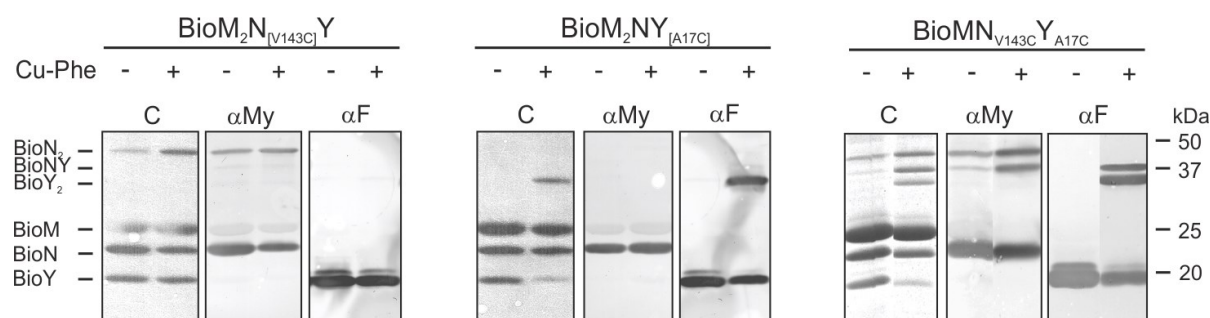


Abb. 20: Chemische Quervernetzung isolierter BioM₂NY-Komplexe zur Identifikation der Verknüpfungsprodukte. Zwei Einzelcysteinvarianten von BioM₂NY mit Cysteinaustauschen in BioN (V143C) oder BioY (A17C) bzw. eine Doppelcysteinvariante mit beiden Austauschen in BioN und BioY (V143C und A17C) wurden aus Membranen isoliert und mit Kupferphenantrolin (Cu-Phe) für 20 min vernetzt. Nach Stoppen der Reaktion mit NEM wurden etwa 3 µg Protein im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (C) sowie parallel nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran mittels monoklonaler Antikörper (αMy gegen BioN-cMyc und αF gegen BioY-FLAG) analysiert.

Nach der Kalibrierung des Laufverhaltens der Quervernetzungsprodukte wurden acht Doppelcysteinvarianten mit Cysteinaustauschen an den Positionen 143 oder 147 in BioN und 12, 13, 16 oder 17 in BioY in Membranen mit Cu-Phe oxidiert und per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 21). Eine Proteinbande im Bereich von 37 kDa zeigte das Heterodimer aus miteinander verknüpften BioN- und BioY-Untereinheiten und damit die räumliche Nähe der jeweiligen Cysteinreste an. Heterodimere Vernetzungsprodukte waren durch Nachweisbarkeit sowohl über das cMyc-Tag an BioN als auch über das FLAG-Epitop an BioY zu erkennen, wohingegen Homodimere (BioN₂ bzw. BioY₂) nur mit einem der beiden Antikörper reagierten. Bei den Kombinationen aus BioN_[V143C] und BioY_[A12C] bzw. _[V16C] bzw. _[A17C] war nach Zugabe von Cu-Phe ein BioNY-Produkt klar erkennbar. Das Verschwinden dieses Produktes nach Reduktion durch 2-Mercaptoethanol deutete auf eine thiol-spezifische Verknüpfung über Cysteinreste hin. Bei den Kombinationen aus BioN_[V147C] und BioY_[V16C] bzw. _[A17C] traten bereits ohne Quervernetzer BioNY-Banden auf, die sich mit Cu-Phe allerdings

deutlich verstärkten. Das Auftreten der BioNY-Heterodimere und insbesondere die intrinsische Vernetzung und schlechte Reduktion durch 2-Mercaptoethanol (2-ME) deutete auf eine große räumliche Nähe der Cysteinreste in einer dichten, hydrophoben Umgebung hin, in die das polare 2-Mercaptoethanol offenbar nur schwer gelangen konnte.

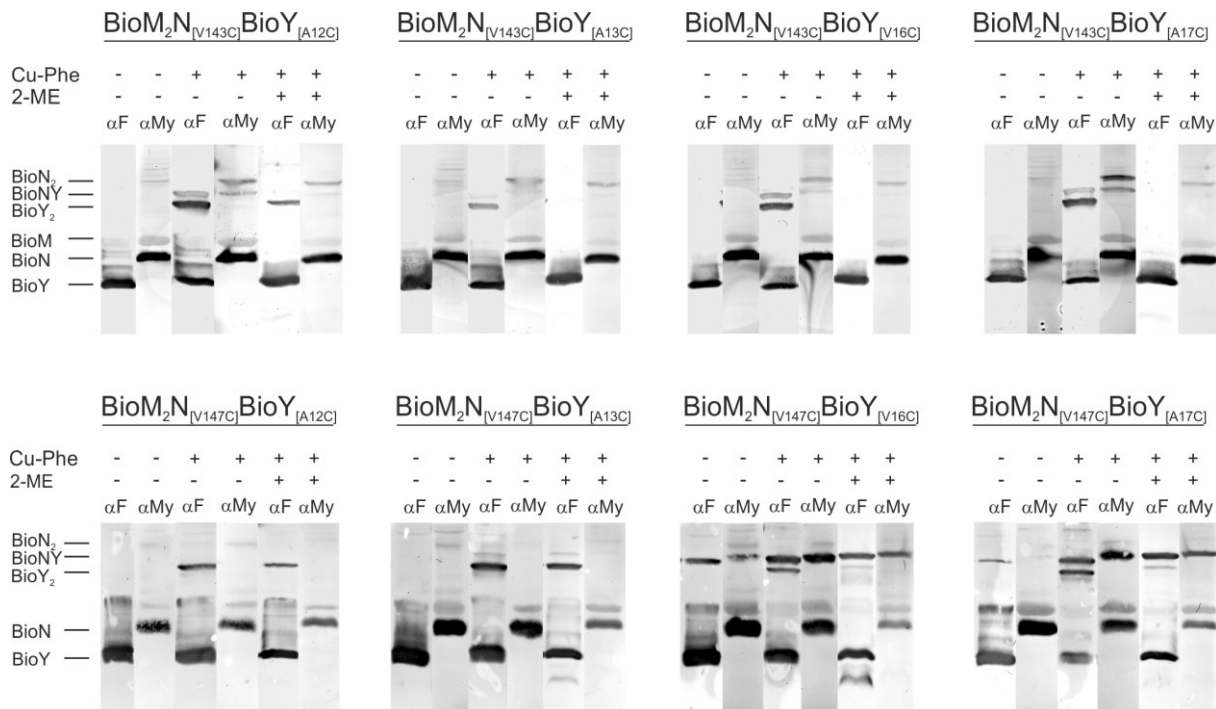


Abb. 21: Quervernetzung von BioN und BioY durch Kupferphenantrolin in Membranen. Isolierte Membranen von Zellen, die Doppelcysteinvarianten von BioM₂NY produzierten, wurden erst mit Kupferphenantrolin (Cu-Phe), dann mit NEM versetzt und anschließend optional mit 2-Mercaptoethanol (2-ME) behandelt und in SDS-haltigem Probenpuffer solubilisiert. Nach SDS-PAGE der Proteine wurden diese im Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit monoklonalen Antikörpern gegen das cMyc-Tag an BioN und das FLAG-Tag an BioY detektiert.

Da Cu-Phe ein sogenannter *Zero-Length-Crosslinker* ist, der nur Aussagen über eine räumliche Nähe von Thiolgruppen, nicht aber über den tatsächlichen Abstand geben kann, wurden weitere Experimente mit den längenspezifischen Bis-Methanthiosulfonat-Quervernetzern EBS (5,2 Å), HBS (10,4 Å) und PBS (24,4 Å) durchgeführt. Ein quantitativer Vergleich der Quervernetzungsprodukte mit den verschiedenen Agenzien im Apo- und im ATP-gebundenen Zustand des Komplexes sollte Aufschluss über die Dynamik des BioN-BioY-Interaktionsbereiches geben. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Anastasia Ogienko im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt (Ogienko, 2014). Dabei wurde zunächst auch das elektrophoretische Laufverhalten der längenspezifisch verknüpften Dimere

charakterisiert, welches sich jedoch nicht von der Mobilität der mit Cu-Phe erzeugten BioNY-Dimere unterschied (nicht gezeigt).

Isolierte Proteine mit jenen Cystein-Kombinationen, die mit Cu-Phe zu deutlich erkennbaren Vernetzungsprodukten geführt hatten, wurden anschließend in Detergenzlösung und nach Rekonstitution in Nanodiscs untersucht. Trotz der hydrophoben Natur der Bis-Methanthiosulfonat-*Crosslinker* konnten in Nanodiscs keine signifikanten Vernetzungsprodukte beobachtet werden. Bei den mit Detergenz solubilisierten Komplexen mit BioN_[V143C] bzw. [V147C] und BioY_[V16C] bzw. [A17C] wurden dagegen deutlich sichtbare BioNY-Vernetzungsprodukte gebildet (Abb. 22). In zwei der drei gezeigten Kombinationen traten bereits ohne vernetzendes Agens BioN-Dimere auf, was schon in früheren Vernetzungsexperimenten in Membranen beobachtet worden war (Neubauer et al., 2011). Um die intrinsische Oligomerisierung so gering wie möglich zu halten, wurden die Ansätze daher vor der Oxidation unter Stickstoffatmosphäre mit 2 mM DTT reduziert. BioM₂N_[V143C]Y_[A17C] zeigte ohne ATP eine favorisierte Vernetzbarkeit mit dem *Crosslinker* mittlerer Länge (HBS). Nach ATP-Zugabe lieferten alle drei Linker vergleichbare Produkte. Ähnlich verhielt sich die Variante BioM₂N_[V147C]Y_[A17C]. Hier trat ohne Nukleotid bevorzugt ein Vernetzungsprodukt mit dem kürzesten Linker (EBS) auf und nach ATP-Beladung entstanden dagegen vergleichbare Produkte mit allen drei Vernetzern. Im Gegensatz dazu kam es bei BioM₂N_[V143C]Y_[V16C] durch die ATP-Zugabe zu einer klaren Verschiebung vom HBS-vermittelten zum EBS-vermittelten Vernetzungsprodukt, was auf eine Abstandsverringerung dieser Positionen hindeutet. Bei den erstgenannten Kombinationen weist ein vergleichbares Auftreten von Vernetzungsprodukten mit allen drei *Crosslinkern* auf eine mit der ATP-Bindung einhergehende erhöhte Flexibilität dieses Interaktionsbereiches hin. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass der Kontakt zwischen BioN und BioY über CH2 und TMH1 nach ATP-Bindung erhalten bleibt, der Interaktionsbereich jedoch eine veränderte Konformation einnimmt. Ein detaillierter Modellausschnitt der untersuchten Region ist in Abb. 22 unten rechts gezeigt.

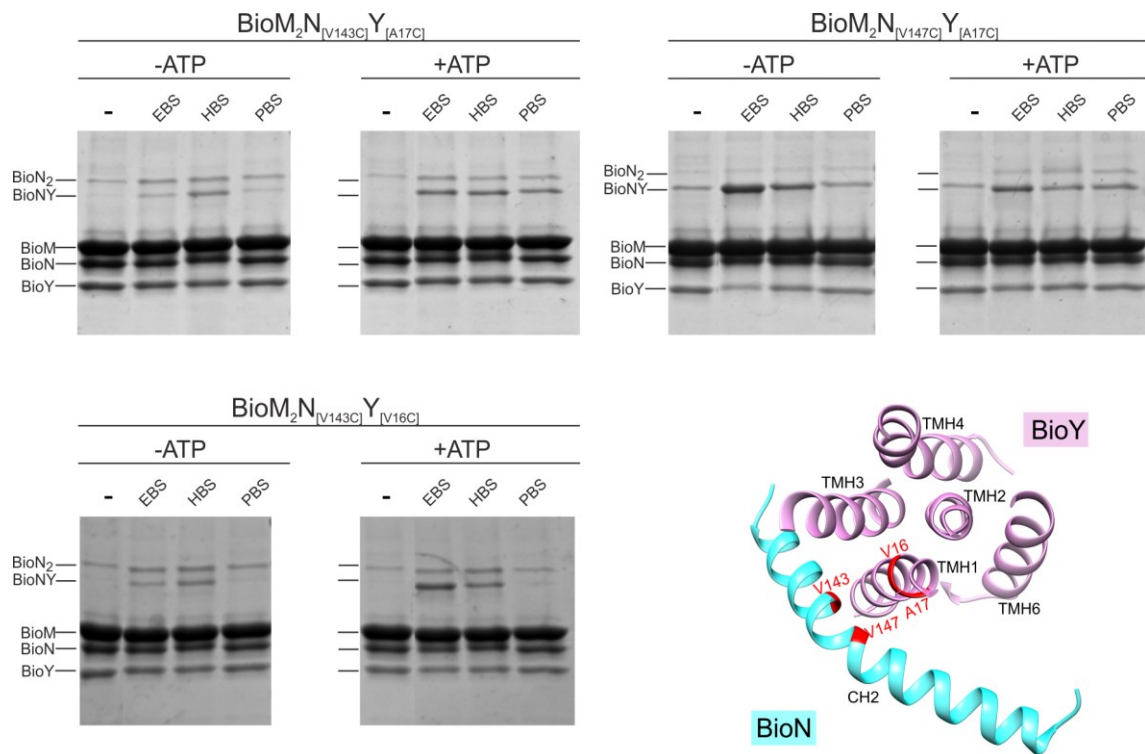


Abb. 22: Längenspezifische Quervernetzung von BioN und BioY. Isolierte Proteine mit einer Konzentration von 500 µg/ml wurden mit 2 mM DTT reduziert und nach Aufteilen der Ansätze wurde eine Hälfte mit 5 mM ATP versetzt. Die anschließende Quervernetzung durch 4 mM EBS (5Å), HBS (10Å) oder PBS (25Å) wurde nach 20 min mit NEM gestoppt, die Proteine wurden in SDS-Probenpuffer ohne Reduktionsmittel denaturiert und per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2015).

2.9 Die Bindung von ATP an BioM führt zur Aufrichtung von BioY

Der zu Beginn dieser Arbeit rein hypothetische Transportmechanismus für ECF-Transporter beinhaltet eine Aufrichtung der S-Einheit als Folge der ATP-Bindung an die ATPasen und des damit einhergehenden Schließens des ATPase-Dimers. Die mit der Aufrichtung verbundene Umorientierung der Substratbindestelle vom Zytosol zur extrazellulären Seite wurde als Voraussetzung für die Substratbindung angesehen. Per massenspektrometrischer Analyse wurde in Abschnitt 2.3 gezeigt, dass der BioM₂NY-Komplex im „as isolated“-Zustand biotinfrei vorliegt. In Übereinstimmung mit dem Strukturmodell von BioM₂NY und den bisher bekannten Kristallstrukturen von ebenfalls substratfreien ECF-Transportern deutete dies darauf hin, dass die Substratbindestelle der S-Einheit in diesem als „Resting State“ bezeichneten Zustand für Substrate tatsächlich nicht zugänglich ist. Um die postulierten topologischen Änderungen der S-Einheit zu beleuchten, wurde die Lage zweier extrazellulärer Schleifen (Loop)-Regionen von BioY nach Markierung mit dem umgebungssensitiven Fluoreszenzlabel

MIANS durch Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Dazu wurden einzelne Cysteine in die Schleifen zwischen TMH1 und TMH2 (L26C, *Loop* 1) bzw. TMH5 und TMH6 (K137C und A152C, *Loop* 3) eingebracht und mit dem thiolreaktiven MIANS gekoppelt. In hydrophober Umgebung liegt dessen Fluoreszenzspektrum weiter im kurzwelligen Bereich (hypsochrom, blauverschoben) als in polarer Umgebung, in der es rotverschoben (bathochrom) ist. Basierend auf der Annahme, dass die *Loop*-Regionen von BioY im Ruhezustand im Komplex vergraben und im aufgerichteten Zustand in die wässrige Umgebung des extrazellulären Raums verlagert sind, sollte eine Umorientierung von BioY über Verschiebungen des MIANS-Fluoreszenzspektrums nachweisbar sein. Eine Beeinträchtigung der Transportfunktion des BioM₂NY-Komplexes durch die Cysteinaustausche in den *Loop*-Regionen wurde mithilfe des biotinauxotrophen Indikatorstammes ausgeschlossen (Abb. 19). Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Miriam Grunzel im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt (Grunzel, 2015).

Zunächst wurden die Emissionsmaxima der mit MIANS gekoppelten BioY-Varianten im gekippten (d.h. im biotinfreien BioM₂NY-Komplex) sowie im aufrechten Zustand ermittelt. Der aufrechte Zustand wurde für solitäres BioY angenommen und entspricht der typischen Orientierung eines Membranproteins mit sechs Membranhelices. In solitärem BioY war Biotin mit einer Stöchiometrie von 1 Biotinmolekül pro 2 BioY-Moleküle enthalten (vgl. Abschnitt 2.3). Auch diese Beobachtung korrelierte mit einer aufrechten Topologie, wodurch die Substratbindestelle an der Außenseite der Membran zugänglich ist. Die Fluoreszenzspektren von zwei (L26C, K137C) der drei markierten BioY-Varianten (Abb. 23) in Detergenzlösung deuteten eine unterschiedliche Polarität der Umgebung beider *Loops* in komplexgebundenem bzw. solitärem BioY an. Das Emissionsmaximum der jeweiligen solitären Variante war zu dem des komplexgebundenen BioY um 3 nm (L26C) bzw. 6 nm (K137C) rotverschoben, was eine erhöhte Umgebungspolarität der *Loops* 1 und 3 im aufgerichteten Zustand anzeigt. An Position 152 konnte kein signifikanter Unterschied der Emissionsspektren ermittelt werden, weshalb diese Variante in weitere Experimente nicht einbezogen wurde.

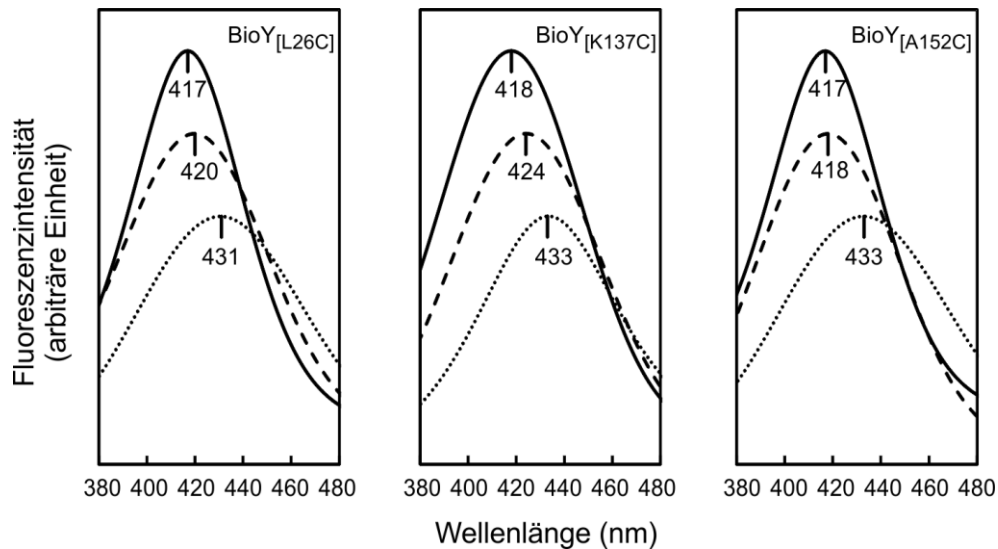


Abb. 23: Fluoreszenzspektren der MIANS-markierten BioY-Varianten. Die BioY-Varianten (2 μ M) wurden solitär (gestrichelte Linie) oder im BioM₂NY-Komplex (durchgehende Linie) aus Membranen isoliert und in Detergenzlösung für 2 h mit MIANS (20 μ M) inkubiert. Nach Abtrennen von überschüssigem Label per Gelfiltration wurden die Fluoreszenzspektren bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm aufgenommen. Die Emissionsmaxima wurden mithilfe des Programmes PEAKFIT über eine Gauß'sche Dekonvolution ermittelt. Die gepunktete Linie gibt das Emissionsspektrum freier, an DTT gekoppelter MIANS-Moleküle in Detergenzlösung an. Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2015).

Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmaxima der gekippten und der mutmaßlich aufrechten BioY-Proteine wurde angenommen, dass eine ATP-induzierte Aufrichtung im Komplex nachweisbar sein müsste. Die Fluoreszenzemissionsspektren der an den Positionen 26 oder 137 in BioY markierten BioM₂NY-Varianten wurden dazu in Detergenzlösung und nach Rekonstitution in Nanodiscs unter Ab- und Anwesenheit von ATP und Biotin bestimmt (Abb. 24). BioM₂NY_[L26C-MIANS] zeigte nach ATP-Zugabe in Detergenz eine Rotverschiebung, die in Gegenwart von Biotin noch deutlich verstärkt wurde. In Nanodiscs trat eine merkliche Verschiebung des Maximums nur in Kombination von ATP und Biotin auf, ATP allein hatte hier keinen messbaren Effekt. Auch bei BioM₂NY_[K137C-MIANS] wurde eine deutliche Rotverschiebung, in Detergenzlösung aber nur in Gegenwart von ATP und Biotin, registriert. Auch hier deutete der bathochrome Effekt von 4 bis 5 nm auf eine Zunahme der Umgebungspolarität der Schleifenregionen nach ATP-Bindung hin, die eine Aufrichtung der BioY-Untereinheit im Komplex nahelegte.

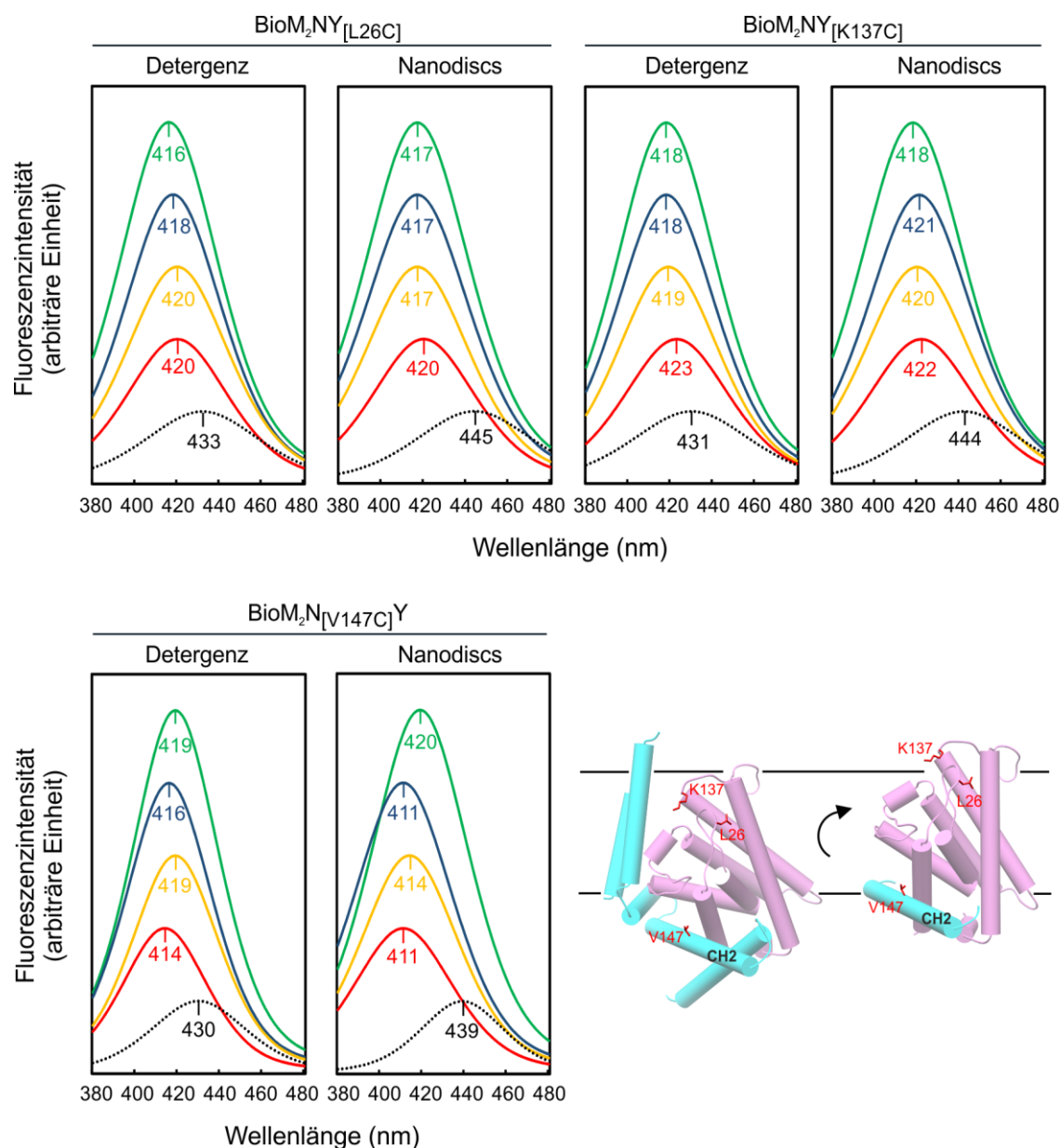


Abb. 24: Fluoreszenzspektren MANS-markierter BioM₂NY-Komplexe in Abhängigkeit von ATP und Biotin. Isolierte BioM₂NY-Komplexe (2 μM) wurden in Detergenz oder nach Einbau in Nanodiscs für 2 h mit 20 μM MANS inkubiert. Nach Abtrennen überschüssigen Labels wurden bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm Fluoreszenzspektren aufgenommen (grün: ohne Substrat, blau: mit 2 mM ATP, gelb: mit 20 μM Biotin, rot: mit 2 mM ATP und 20 μM Biotin). Die gepunktete Linie gibt das Emissionsspektrum freier, mit DTT gekoppelter MANS-Moleküle in Detergenzlösung an. Emissionsmaxima wurden mithilfe des Programmes PEAKFIT über eine Gauß'sche Dekonvolution ermittelt, die Spektren stellen repräsentative Ergebnisse aus drei Messreihen dar. Der Modellausschnitt unten rechts zeigt die Umorientierung der MANS-markierten Positionen infolge einer ATP-induzierten Aufrichtung von BioY. Abbildung modifiziert nach Finkewirth *et al.* (2015).

Erstaunlicherweise bewirkte in manchen Fällen bereits die alleinige Zugabe von Biotin eine Rotverschiebung der Fluoreszenzemissionen (in Detergenz bei BioM₂NY_[L26C-MANS] und in

Nanodiscs bei BioM₂NY_[K137C-MIANS]). Spätere Versuche mit detergenzsolubilisierten BioM₂NY-Komplexen zeigten, dass die alleinige Zugabe von Biotin zum Transporter-Komplex eine Dissoziation von BioY bewirkt. Dieser Effekt wird in Abschnitt 2.11 näher beleuchtet. Obwohl keine Aussagen darüber getroffen werden können, ob dieser Effekt auch in einer Membrenumgebung auftritt, könnte ein Herauslösen von BioY aus dem Holotransporter mit einer Umorientierung der MIANS-markierten Regionen einhergehen und für die beobachtete Rotverschiebung verantwortlich sein. Bei BioM₂N_[V147C-MIANS]Y führte die ATP-Bindung zu einer hypsochromen Verschiebung und somit zu einem gegenteiligen Effekt (Abb. 24). Die dadurch angezeigte Zunahme der Hydrophobizität ließ vermuten, dass die ATP-Beladung der ATPasen zu einer Verlagerung der CH₂ von BioN (in der die Position 147 lokalisiert ist) in die Membran führt.

2.10 Die ATP-induzierte Aufrichtung von BioY führt zur Substratbindung

Die im vorangegangenen Abschnitt beobachteten Änderungen der Umgebungspolarität der Schleifenregionen von BioY sowie der CH₂ von BioN stützen die Hypothese der ATP-induzierten Aufrichtung der S-Einheit, die durch das geschlossene BioM-Dimer über die Kopplungshelices nach oben gedrückt wird. Anhand von isolierten BioM₂NY-Komplexen sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob diese Konformationsänderung zu einer Substratbindung an BioY führt. Erste Hinweise auf eine ATP-induzierte Bindung von Biotin durch BioM₂NY hatte die massenspektrometrische Substratanalyse der gereinigten Proteine geliefert. In Abschnitt 2.3 war zunächst gezeigt worden, dass der Transporter im gereinigten Zustand ohne Substrat vorliegt. Die Zugabe von 2 mM ATP und 50 µM Biotin während der Reinigung führte nicht zur Beladung ($6 \pm 0,17$ pmol Biotin pro 500 pmol Protein). Wegen der ubiquitären Verfügbarkeit von Magnesium-Ionen während der Solubilisierung war von einer steten ATP-Hydrolyse auszugehen, die eine stabile ATP-Bindung und somit Biotinbindung an den Komplex vermutlich verhinderte. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die in Abschnitt 2.7 bereits hinsichtlich ihrer Transport- und ATPase-Aktivität charakterisierte hydrolysedefiziente Transporter-Variante BioM_[E161Q]2NY eingesetzt. Der Austausch des sogenannten katalytischen Carboxylats Glu-161 hinter dem *Walker B*-Motiv gegen Glutamin hatte zu einer Inaktivierung der ATPasen geführt. Damit war zwar eine Bindung von ATP, jedoch keine Hydrolyse mehr möglich. Nach Reinigung dieser Variante wurden per LC-MS mit $27 \pm 9,9$ pmol Biotin pro 500 pmol Protein deutliche Spuren von Substrat nachgewiesen, die

auf eine bestehende Beladung in Anwesenheit von gebundenem ATP hindeutete. Um den Einfluss von ATP auf die Beladung zu überprüfen, wurden 2 mM ATP, 10 mM MgCl_2 und 50 μM Biotin während der Solubilisierung hinzugefügt. Dadurch stieg dieser Wert auf 45 ± 30 pmol Biotin pro 500 pmol Protein, was einem Beladungsverhältnis von etwa 1:10 (Biotin pro BioM_2NY) entspricht.

Um der Frage nachzugehen, ob isolierte substratfreie Transporter-Komplexe in Gegenwart von ATP mit Biotin beladbar waren, wurden wildtypisches BioM_2NY sowie eine cysteinfreie Variante und die hydrolysedefiziente Variante $\text{BioM}_{[\text{E161Q}]2}\text{NY}$ in Abwesenheit von Liganden und nach Zugabe von ATP plus EDTA oder ATP plus MgCl_2 in Nanodiscs mit radioaktiv markiertem Biotin inkubiert. Anschließend wurde die gebundene Biotinmenge detektiert (Abb. 25). Die E161Q-Variante wurde aus Zellen isoliert, die in biotinfreiem Mineralmedium angezogen worden waren, um eine Vorbeladung mit Biotin auszuschließen. Ohne ATP wurden in drei unabhängigen Experimenten durch den wildtypischen Transporter 0,9 - 0,14, durch die cysteinfreie Variante 0,29 - 0,34 und durch $\text{BioM}_{[\text{E161Q}]2}\text{NY}$ 0,22 - 0,32 pmol Biotin pro pmol Protein gebunden. Die ATP-Zugabe erhöhte diese Werte jeweils auf etwa das Doppelte. Wurde gleichzeitig Magnesium beigelegt, sank die Beladung bei wildtypischem und cysteinfreiem BioM_2NY auf das Hintergrundniveau. Bei der E161Q-Variante führte Mg^{2+} zu einem weiteren leichten Anstieg. Diese Zunahme der detektierten Biotinmenge bestätigte die Hypothese einer ATP-abhängigen Substratbindung. Gleichzeitig wurde aus den Daten deutlich, dass die Substratabgabe offenbar mit der ATP-Hydrolyse verbunden war, welche bei der E161Q-Variante inhibiert ist. Bestätigt wurde dies durch die verminderte Biotinbindung des wildtypischen Komplexes im posthydrolytischen Zustand. So konnte in Gegenwart von MgADP nur Hintergrundbeladung detektiert werden. Durch Zugabe von 20 mM ADP zu einer Probe, die zuvor mit 2 mM ATP inkubiert worden war, sollte durch Verdängung des gebundenen ATPs ein dem posthydrolytischen Stadium entsprechender Zustand erreicht werden. Dies führte ebenfalls zu einer messbaren Verringerung des komplexgebundenen Biotins.

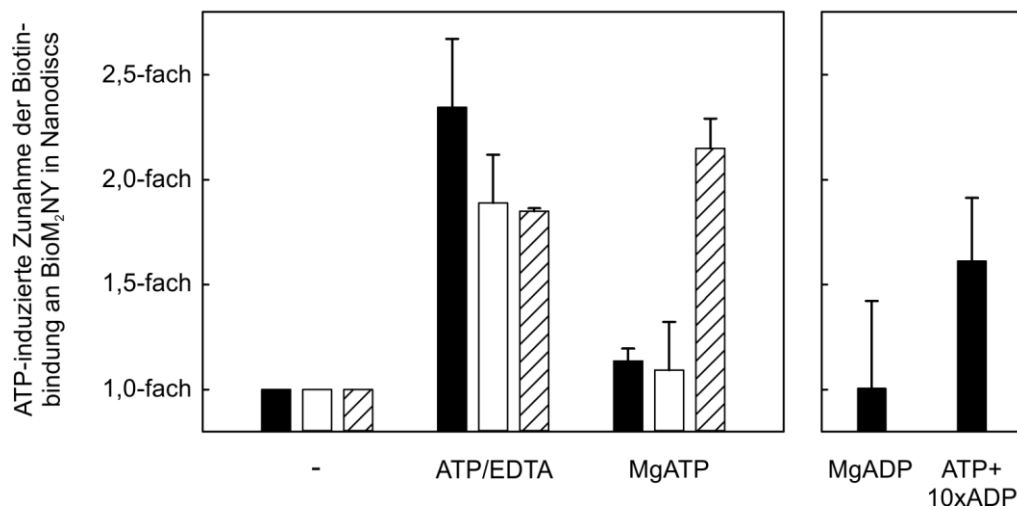


Abb. 25: Biotinbindung durch BioM₂NY in Nanodiscs als Folge der ATP-Bindung. Nanodiscs mit wildtypischen (schwarz), cysteinfreien (weiß) oder hydrolysedefizienten (schraffiert) BioM₂NY-Komplexen wurden für 20 min mit 50 μ M [³H]Biotin ohne Liganden bzw. mit 2 mM ATP und 0,5 mM EDTA oder 2 mM ATP und 5 mM MgCl₂ inkubiert. Nach Gelfiltration zur Abtrennung ungebundener Substrate wurde gebundenes Biotin per Flüssigkeitsszintillationszählung quantifiziert. Die mittlere gemessene Biotinmenge unter Abwesenheit von ATP ist als 1-fach und die Zunahme der Biotinbindung mit ATP/EDTA oder MgATP ist als Änderung in Relation zum ATP-freien Wert angegeben. Die Werte repräsentieren die mittleren Zunahmen des quantifizierten Biotins aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Sowohl die Zunahme der Biotinbindung durch ATP als auch die Abnahme nach ATP-Hydrolyse sind statistisch signifikant ($p < 0,05$; zweiseitiger gepaarter t-Test). Abbildung modifiziert nach Finkenwirth *et al.* (2015).

2.11 Analyse der Komplexstabilität von BioM₂NY in Abhängigkeit von Liganden

In den bisherigen Abschnitten wurde die ATP-induzierte Aufrichtung der S-Einheit, die ein Schlüsselmerkmal des Transportmechanismus von ECF-Transportern darstellt, anhand des Biotintransporters BioM₂NY aus *R. capsulatus* erstmals experimentell belegt. Über den Nachweis von radioaktiv markiertem Biotin konnte gezeigt werden, dass diese Aufrichtung der S-Einheit nach ATP-Bindung an die ATPasen eine Voraussetzung für die Substratbeladung darstellt. Im Kontext der variablen Substratspezifität von ECF-Transportern der Subklasse II, bei denen ein ECF-Modul mit verschiedenen S-Einheiten interagiert, war ein ATP-abhängiger Abwurfmechanismus für die S-Einheit postuliert worden (Karpowich *et al.*, 2015). Mit ihrer Hypothese, dass durch ATP-Bindung an die ATPasen zunächst eine Dissoziation der substratfreien und anschließend die Bindung einer neuen, substratbeladenen S-Einheit erfolgen würde, hatten Karpowich und Kollegen eine Grundlage für den partnertauschenden

Mechanismus vorgeschlagen. Da es für eine ATP-induzierte Dissoziation der BioY-Einheit vom BioM₂NY-Komplex bisher jedoch keine Hinweise gegeben hatte, stellte sich die Frage, ob hierin ein mechanistischer Unterschied der beiden Subklassen liegen könnte.

Um eine klare Aussage über den Zusammenhalt der Transporter-Komponenten nach ATP-Beladung treffen zu können, wurde gereinigtes BioM₂NY per Größenausschlusschromatographie (SEC) analysiert. Dabei wurden dem Puffer während des gesamten Gelfiltrationslaufes 2 mM DTT hinzugefügt, um der Präzipitation des Komplexes unter der für die SEC notwendigen hohen Proteinkonzentration von etwa 50 µM vorzubeugen. Da die Zugabe von DTT während der Reinigung von Transporter-Varianten mit künstlich eingefügten Cysteinen in den ATPasen zu einer erhöhten Stabilität und Ausbeute geführt hatte, war auch bei wildtypischem BioM₂NY von einem stabilisierenden Effekt auszugehen, welches drei natürliche Cysteinreste in BioM und einen in BioN trägt. Das in Abb. 26A dargestellte Gelfiltrationsprofil des Holotransporters wies einen Hauptpeak auf, der alle drei Komponenten von BioM₂NY enthielt. Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel in Abb. 26A zeigt die Proteine aus den vereinten Peak-Fractionen (Elutionsvolumina 11,5 - 13 ml) und offenbart eine Unterrepräsentanz von BioY gegenüber BioM und BioN, was auf eine polydisperse Zusammensetzung der isolierten Komplexe hinweist.

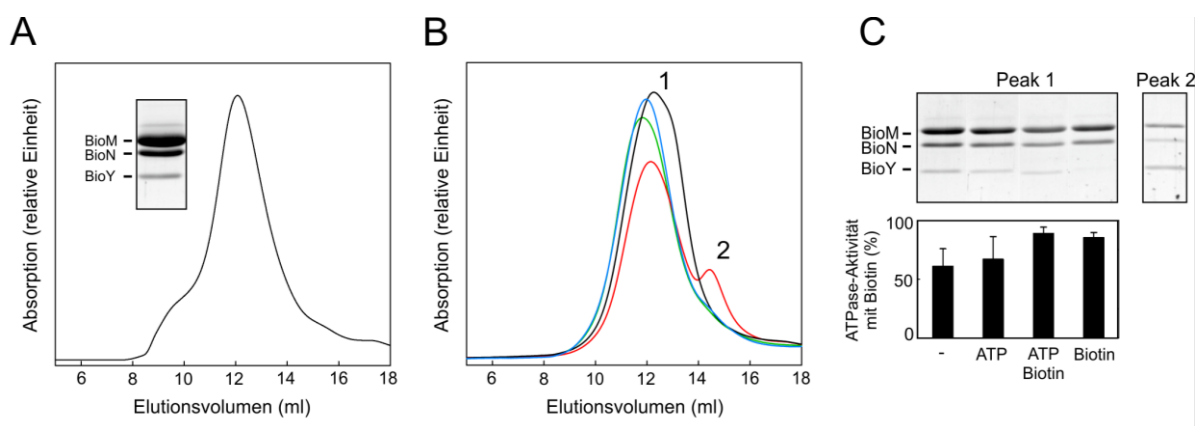


Abb. 26: Gelfiltrationsanalyse isolierter BioM₂NY-Komplexe in Abhängigkeit von Liganden. **A)** 3 mg des aus Membranen isolierten Biotintransporters BioM₂NY wurden einer Gelfiltration unterzogen und die Peak-Fractionen vereint. **B)** Nach Aufteilen in vier gleich große Ansätze wurden Proben ohne Zusatz (schwarz), mit 20 µM Biotin (rot), mit 2 mM ATP (grün) oder mit ATP und Biotin (blau) versetzt und erneut per Gelfiltration analysiert. Die Chromatogramme zeigen repräsentative Ergebnisse aus zwei Experimenten. **C)** Die vereinten Fraktionen der jeweiligen Peaks in **B** (Peak 1 und Peak 2) wurden konzentriert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Aktivitäten geben die durch Biotin (3,2 µM) gehemmten ATPase-Aktivitäten der isolierten Transporter-Komplexe (0,8 µM) an.

Nach Vereinigung der Peak-Fractionen (Elutionsvolumina 11,5 - 13 ml) wurde die Probe viergeteilt und unter Anwesenheit von ATP oder ATP und Biotin oder nur Biotin einer erneuten Gelfiltration unterzogen, um einen möglichen Einfluss der Substrate auf die Stabilität des Transporters zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass ATP allein keinen Effekt auf die Zusammensetzung des Komplexes hatte, während die Zugabe von Biotin eine Dissoziation von BioY bewirkte (Abb. 26B). Bei der Probe, die mit Biotin versetzt worden war, trat hinter dem ersten, größeren Peak (Peak 1) bei späterem Elutionsvolumen ein weiteres Signal auf (Peak 2). Die Analyse der jeweiligen Fraktionen per SDS-PAGE offenbarte, dass der Komplex in BioMN und BioY zerfallen war (Abb. 26C). Dieser biotinbedingte Zerfall von BioM₂NY wurde allerdings durch gleichzeitige Anwesenheit von ATP verhindert, wie das Chromatogramm der entsprechenden Probe in Abb. 26B und die SDS-PAGE-Analyse der Peak-Fractionen in Abb. 26C zeigen. Dass ATP keineswegs einen Auswurf der S-Einheit BioY bewirkt, bestätigt die Beobachtungen der Quervernetzungsexperimente in Abschnitt 2.8, die auch nach Beladung des Transporters mit ATP eine Interaktion von BioN und BioY angezeigt hatten. Diese Stabilität des Komplexes nach ATP-Beladung impliziert einen mechanistischen Unterschied zu den ECF-Transportern der Subklasse II, für welche das Prinzip einer Herauslösung der substratfreien S-Einheit aus dem Transporter-Komplex vorgeschlagen worden war (Karpowich et al., 2015).

Auf der Grundlage struktureller Analysen des folatspezifischen ECF-Transporters EcfA1A2T-FolT aus *Lactobacillus delbrueckii* war gefolgert worden, dass ein gleichzeitig ATP- und substratgebundener Zustand bei ECF-Transportern generell nicht existieren könne (Swier et al., 2016). Im Modell dieser Autoren würde nach der ATP-induzierten Dissoziation der substratfreien S-Einheit vom Komplex zunächst die Hydrolyse von ATP erfolgen, bevor eine neue, substratbeladene S-Einheit schließlich an den posthydrolytischen Komplex bände. Die Beobachtung des vorangegangenen Experiments in der vorliegenden Arbeit, dass ATP die durch Biotin bewirkte Dissoziation der BioY-Einheit kompensierte, steht hierzu im Widerspruch, da dies auf eine gleichzeitige ATP- und Substratbindung des Komplexes hindeutete. Um die Existenz von sowohl ATP als auch Biotin enthaltenden BioM₂NY-Komplexen zu untermauern, wurde BioM₂NY über das N-terminale His-Tag an BioM an einer Ni-NTA-Agarosematrix immobilisiert und die Beladung mit radioaktiv markiertem Biotin untersucht. Der alleinige Zusatz von Biotin führte zur Ablösung von BioY, das mit dem Waschpuffer entfernt wurde (Abb. 27A). Bei gleichzeitiger Zugabe von ATP und Biotin blieb der Holotransporter jedoch erhalten und konnte deutliche Mengen des Vitamins binden. Nach ATP-Hydrolyse, die durch Magnesium-Zugabe induziert wurde, waren dagegen nur noch Spuren von BioY und folglich

auch nur Spuren von Biotin nachweisbar. Biotin hatte demnach im posthydrolytischen Zustand des Komplexes die gleiche Wirkung wie im nukleotidfreien Zustand. Die hydrolysedefiziente Transporter-Variante BioM_{[E161Q]2}NY war dagegen auch mit MgATP und Biotin stabil (Abb. 27B). Per Pixelanalyse der Proteinbanden aus Abb. 26A mithilfe der Software „GelScan 5“ wurde bei den Proben des wildtypischen Transporters, die alle drei Komponenten enthielten, ein mittleres BioM:BioN:BioY-Verhältnis von etwa 8:4:1 bestimmt. Da die zum Biotinnachweis eingesetzten Proben etwa 800 pmol des Komplexes enthielten, der Pixelanalyse zufolge jedoch nur jeder vierte Komplex einen vollständigen BioM₂NY-Transporter repräsentierte (200 pmol), konnte bei einer detektierten Biotinmenge von $41,8 \pm 9$ pmol auf eine Beladung etwa jedes fünften BioM₂NY-Komplexes rückgeschlossen werden.

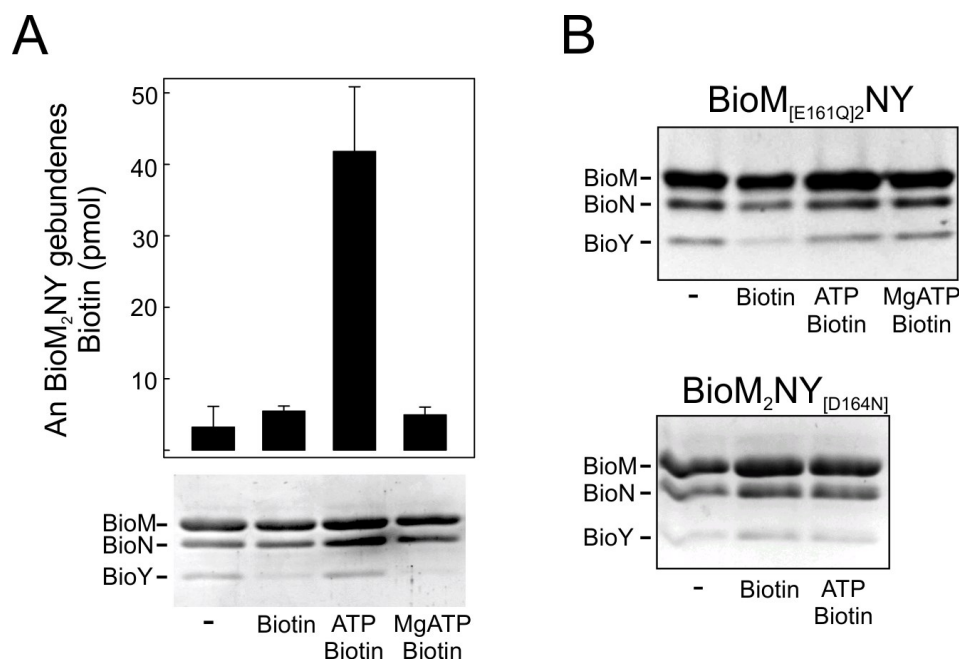


Abb. 27: Komplexstabilität an Ni-NTA-Agarose gebundener BioM₂NY-Komplexe in Abhängigkeit von Liganden. **A)** Gereinigte BioM₂NY-Komplexe (2,5 μ M) wurden für 12 h bei 4 °C mit Ni-NTA-Agarosematrix und optional 50 μ M [³H]-Biotin, 2 mM ATP und 10 mM MgCl₂ inkubiert. Nach Waschen der über BioM an die Matrix gebundenen Komplexe mit 2fachem Säulenvolumen wurden diese mit 300 mM Imidazol eluiert und konzentriert. Etwa 800 pmol des Komplexes wurden zum Biotinnachweis per Flüssigkeitsszintillationszählung und 50 pmol zur SDS-PAGE eingesetzt. **B)** Die Untersuchung der Komplexstabilität der hydrolyseinaktiven Variante BioM_{[E161Q]2}NY und der mit Biotin nicht beladbaren Variante BioM₂NY_[D164N] wurde mit unmarkiertem Biotin durchgeführt.

Ob der Zerfall des Komplexes nach Biotinzugabe der artifiziellen Umgebung in Detergenzlösung geschuldet ist oder auch in einer Membranumgebung auftritt, ließ sich auf der Basis dieser experimentellen Daten nicht beurteilen. Um jedoch die Spezifität dieses Effektes

als Resultat der Biotinbindung an BioY zu belegen, wurde der Versuch mit BioM₂NY_[D164N] durchgeführt, das durch den Asparaginaustausch in TMH6 von BioY kein Biotin mehr binden kann (vgl. Abschnitt 2.1.3) (Kirsch et al., 2012). Ein Zerfall nach Biotinzugabe war hier nicht zu beobachten (Abb. 27B). Dies bestätigt, dass die Konformation, die BioY durch die spezifische Biotinbindung einnimmt, offenbar nicht mit der gekippten Topologie (im ATP-freien Zustand) kompatibel ist und eine stabile Substratbindung durch BioY im Komplex nur unter Anwesenheit von ATP möglich ist.

2.12 Bedeutung der Q-Helix in BioM für die Stabilisierung der ATP-Beladung

Die sogenannte Q-Helix ist ein ausschließlich in ECF-ATPasen vorkommendes Motiv mit der konservierten Sequenz xPD/ExQ ϕ (x steht für eine beliebige, ϕ für eine hydrophobe Aminosäure), das eine kurze Windung zwischen der katalytischen und der helikalen Domäne hinter dem Q-Loop darstellt. Die Kristallstruktur des ADP-gebundenen ECF-ATPase-Dimers aus *Thermotoga maritima* (pdb-Code: 4HLU) hatte Hinweise dafür geliefert, dass die Q-Helix sowohl für die Stabilisierung des ATPase-Dimers als auch für die Interaktion der ATPasen mit der T-Komponente von Bedeutung ist (Karpowich und Wang, 2013). Aufgrund einer Salzbrücke zwischen dem Glutamatrest (Glu-88) in der Q-Helix und einem konservierten Argininrest (Arg-145) hinter dem Signaturmotiv von *TmEcfA1A2* war die Theorie einer „molekularen Bremse“ vorgeschlagen worden. Laut dieser Hypothese könnte die Salzbrücke zwischen diesen beiden Seitenketten das vollständige Schließen des ATPase-Dimers nach Bindung zweier ATP-Moleküle behindern und damit eine vom Substrattransport abgekoppelte ATP-Hydrolyse minimieren. Erst mit der Substratbindung an die S-Einheit und einer hypothetischen Übertragung dieses Signals durch Konformationsänderung der T-Einheit auf die Q-Helix würde diese Salzbrücke und damit „Bremse“ gelöst werden, sodass die helikale Domäne mit dem Signaturmotiv auf die katalytische Domäne der anderen ATPase zuschwingen und ATP stabil gebunden werden könnte. Auch die Q-Helix von BioM aus *R. capsulatus* enthält einen sauren Rest (Asp-86, s. Abb. 28B). Untermauert wurde die Hypothese durch die Beobachtung, dass der Austausch von Asp-86 in BioM gegen Cystein im Rahmen einer dezidierten Quervernetzungsstudie von BioM₂N zu einer deutlich erhöhten ATPase-Aktivität des gereinigten Transporters in Detergenzlösung geführt hatte (Neubauer et al., 2011). Die hohe Aktivität war auf die fehlende Salzbrücke zwischen Asp-86 und dem Argininrest hinter dem Signaturmotiv (Arg-141) zurückgeführt worden (Neubauer, 2013).

Die ATPase-Aktivitäten von wildtypischem und cysteinfreiem BioM₂NY wurden durch Biotin allerdings nicht stimuliert. Wie bereits in Abschnitt 2.4 gezeigt wurde, hatte Biotin vielmehr einen leicht hemmenden Effekt auf die Aktivität dieser Transporter-Varianten (Abb. 13 und Abb. 28A). Zwar wurde die Transporter-Variante mit inaktivierter Biotinbindestelle (BioM₂NY_[D164N]) in ihrer Aktivität ebenfalls leicht durch Biotin gehemmt, obwohl diese Biotin nicht stabil binden kann (Abb. 28A). Ein Vergleich der per Gelfiltration isolierten BioM₂NY- und BioM₂N-Komplexe in Abschnitt 2.11 hinsichtlich ihrer ATPase-Aktivität hatte allerdings gezeigt, dass der beobachtete Effekt von Biotin von BioY abhängt (Abb. 26C).

Um die Rolle der vermuteten Salzbrücke zwischen der Q-Helix und der Nachbarschaft des Signaturmotivs in BioM₂NY näher zu untersuchen, wurden Asp-86 durch Lysin und Asparagin sowie Arg-141 durch Glutamat ersetzt. Wie von Neubauer *et al.* in Detergenzlösung beobachtet worden war (Neubauer *et al.*, 2011), war die Aktivität der D86C-Variante auch in Nanodiscs etwa 60 % höher als die des cysteinfreien Transporters und damit beinahe auf Wildtyp-Niveau. Die Lysin- und Asparaginaustausche anstelle von Asp-86 sowie der R141E-Austausch führten dagegen zu Aktivitäten, die 30 bis 40 % unter der des wildtypischen Transporters lagen. Da nur der Cysteinaustausch mit einer verstärkten Hydrolyse verbunden war, konnte die fehlende Salzbrücke zwischen den Positionen 86 und 141 nicht für die Aktivitätserhöhung verantwortlich sein. In Abschnitt 2.5 wurde gezeigt, dass die Q-Helices der beiden BioM-Monomere sehr nah beieinander liegen. Um eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten der BioM_{[D86C]2}NY-Variante als Ursache für die hohe Aktivität auszuschließen, wurde die ATP-Hydrolyse unter Anwesenheit von 2-5 mM DTT quantifiziert. Unter reduzierenden Bedingungen trat jedoch keine Veränderung auf (nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden zwei Transporter-Varianten untersucht, die Cysteinaustausche in der unmittelbaren Nachbarschaft von Asp-86 tragen (H87C und Q88C, s. Modell in Abschnitt 2.5). Dabei zeigte jedoch nur die Q88C-Variante eine gegenüber dem cysteinfreien Transporter verstärkte ATP-Hydrolyse (170 %), die durch DTT ebenfalls nicht beeinflusst wurde (nicht gezeigt). Da die Zugabe von 2 mM DTT eine BioM-Dimerisierung über D86C und Q88C im Rahmen der Quervernetzung unter Abschnitt 2.5 verhindert hatte (Abb. 14A), die ATPase-Aktivität jedoch nicht durch DTT beeinflusst wurde, musste davon ausgegangen werden, dass die Aktivitätserhöhung durch die D86C- und Q88C-Austausche bewirkt wurde.

Veränderungen in der Q-Helix beeinflussten jedoch nicht nur die Grundaktivität des Transporters, sondern wirkten sich auch auf den Effekt von Biotin auf die ATP-Hydrolyse aus.

Während beim wildtypischen Komplex eine leichte Inhibierung der ATP-Hydrolyse durch Biotin beobachtet wurde, führten alle Austausche des Arg-86, His-87 oder Gln-88 zu einer Stimulation (Abb. 28A). Die Transporter-Variante, die anstelle des Arg-141 hinter dem Signaturmotiv einen Glutamatrest trägt, zeigte dagegen eine nahezu fünfzig prozentige Aktivitätsabnahme.

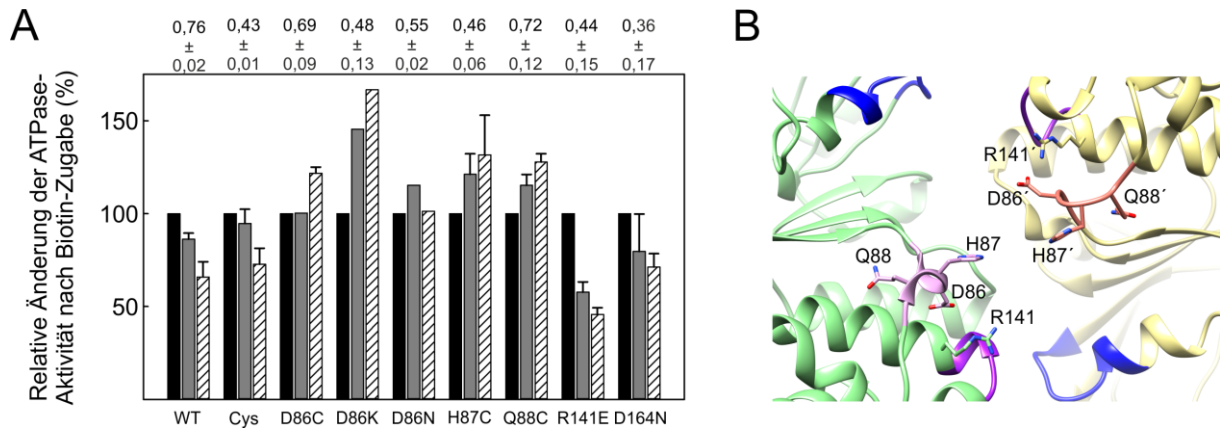


Abb. 28: ATPase-Aktivität von BioM₂NY-Varianten. **A)** Änderung der ATPase-Aktivität in Nanodiscs rekonstituierter BioM₂NY-Varianten durch Biotin-Zugabe in 2-fachem (grau) oder 20-fachem Überschuss (schraffiert) gegenüber dem substratfreien Zustand (schwarz, als 100 % definierte Aktivitäten mit Standardfehler oben stehend). Angegeben sind einfache Messwerte oder Mittelwerte aus bis zu vier Messungen mit Standardfehler. **B)** Vergrößerter Ausschnitt des BioM₂-Dimers aus dem BioM₂NY-Modell mit Markierung der Q-Helices (violett und hellbraun) und der relevanten Aminosäure-Seitenketten. Weiterhin sind die Walker A-Motive in blau und die Signaturmotive in lila dargestellt.

Die Transporter mit Aminosäureaustauschen in der Q-Helix waren alle funktionell. Eine Störung der Transportfunktion wurde lediglich bei der R141E-Variante beobachtet, die nur ein sehr schwaches Wachstum des biotinauxotrophen Referenzstammes bewirkte (Abb. 19). Da der Wachstumstest zwar Aussagen über die Transportfunktion als solche, nicht aber über die Effektivität der Transportaktivität zulässt, wurde überprüft, ob Einbußen in der Biotinbindung gereinigter Komplexe nachweisbar waren. Dazu wurde die ATP-abhängige Beladung der Transporter-Varianten in Nanodiscs untersucht (vgl. Abschnitt 2.10). Verglichen mit dem wildtypischen Transporter zeigten die Varianten mit D86K-, D86N-, H87C-, Q88C- und R141E-Austauschen allesamt eine Beeinträchtigung der ATP-stimulierten Biotinbindung (Abb. 29). Bei den D86K- und R141E-Varianten war eine stabile Beladung des Transporter-Komplexes sogar nahezu unmöglich.

Zusammengenommen sprechen die hemmende Wirkung von Biotin auf den wildtypischen Transporter und die stimulierende Wirkung bei Varianten, in denen die mutmaßliche Salzbrücke zwischen der Q-Helix und der Region hinter dem Signaturmotiv fehlt, gegen die Idee einer „molekulare Bremse, wie sie von Karpowich *et al.* vorgeschlagen worden war. Die Stimulierung der ATP-Hydrolyse durch Biotin bei den Transportern mit D86C-, D86K-, D86N, H87C- und Q88C-Austausch in BioM deutete eher auf einen generell destabilisierenden Effekt der Aminosäureaustausche für das ATPase-Dimer hin, der durch Zugabe von Biotin und die damit einhergehende Konformationsänderung von BioY in irgendeiner einer Form kompensiert werden könnte. Dass die untersuchten Aminosäurereste in der Q-Helix eine Bedeutung für die Stabilität des BioM-Dimers und damit auch für die Interaktion von BioM mit BioN haben, zeigt sich auch an der beeinträchtigten Biotinbeladung der entsprechenden Austauschvarianten. Die Effektivität der Übertragung ATP-induzierter Konformationsänderungen von BioM₂ über BioN auf BioY war offenbar deutlich geschwächt.

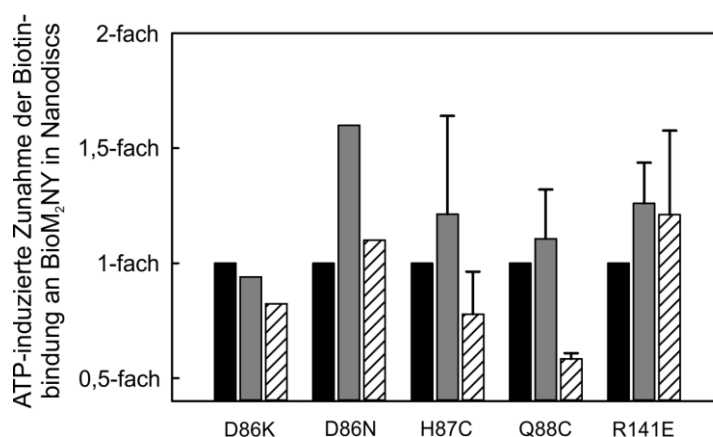


Abb. 29: Biotinbeladung von BioM₂NY-Varianten mit Veränderungen in der Q-Helix. Nanodiscs mit BioM₂NY-Varianten wurden für 20 min mit [³H]Biotin ohne Liganden (schwarz), mit ATP/EDTA (grau) oder MgATP (schraffiert) inkubiert. Nach Gelfiltration zur Abtrennung ungebundener Substrate wurde gebundenes Biotin per Flüssigkeitsszintillation quantifiziert. Die mittlere gemessene Menge gebundenen Biotins unter Abwesenheit von ATP ist als 1-fach, die Zunahme unter Anwesenheit von ATP/EDTA oder MgATP als Änderung relativ zum ATP-freien Wert angegeben. Die Angaben repräsentieren einfache Messwerte oder die mittleren Änderungen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

2.13 Die Rolle von CbiN für die Substratbeladung der kobaltspezifischen S-Einheit CbiM

Neben organischen Mikronährstoffen gehören auch die Übergangsmetallionen Ni^{2+} und Co^{2+} zu den Substraten von ECF-Transportern (Rodionov et al., 2009; Rodionov et al., 2006). Metallspezifische ECF-Transporter gehören ausschließlich der Subklasse I an (Eitinger et al., 2011) und besitzen zusätzlich zu ihren ATPasen (Nik/CbiO), der T-Komponente (Nik/CbiQ) und der S-Einheit (Nik/CbiM) ein weiteres kleines Membranprotein (Nik/CbiN), welches aus zwei TMHs und einem dazwischen liegenden *Loop* aus bis zu 60 Aminosäuren besteht und für die Transportfunktion obligatorisch ist (Kirsch und Eitinger, 2014; Siche et al., 2010). NikN ist bei einem Großteil der Nickeltransporter mit NikM fusioniert oder durch NikL ersetzt, welches häufig mit dem noch kleineren Membranprotein NikK kombiniert ist (Zhang et al., 2009). Strukturelle Daten sind bisher nur für NikM2 aus *T. tengcongensis* bekannt, das sowohl mit Ni^{2+} (pdb-Code 4M58) als auch mit Co^{2+} (4M5C) kristallisiert worden ist und abgesehen von der zusätzlichen N-terminalen Helix mit anderen S-Einheiten topologisch nahezu identisch ist (Yu et al., 2014). Die einheitliche Topologie lässt vermuten, dass metallspezifische ECF-Transporter ebenfalls nach einem Kippmechanismus funktionieren könnten, in dem die kleinen Komponenten Nik/CbiN bzw. NikL/KL eine spezielle Funktion einnehmen. Bei Versuchen, den vierteiligen Komplex CbiMNQO aus *R. capsulatus* aus Membranen zu isolieren, war die CbiN-Komponente stets verloren gegangen (Siche et al., 2010). Der stabile dreiteilige Komplex aus CbiM (S), CbiQ (T) und CbiO (A) glich in seiner Zusammensetzung anderen ECF-Transportern (BioM₂NY eingeschlossen), die nach Isolation aus Membranen im substratfreien Ruhezustand vorlagen (Zhang, 2013). Da CbiN mit den anderen Komponenten in diesem mutmaßlichen Ruhezustand offenbar nicht stabil interagiert, gleichzeitig aber für die Transportfunktion essentiell ist, war angenommen worden, dass die Rolle von CbiN in der Substratbeladung der S-Einheit liegen könnte (Siche et al., 2010). Es ist vorstellbar, dass die Positionierung des N-Terminus von CbiM und NikM, der jeweils drei von vier Metallliganden stellt, eine Assistenz erfordert, die die Bewegung der TMH1 und des freien N-Terminus einschränkt.

Mithilfe einer künstlichen Fusion von Cbi(MN), die an die natürlicherweise fusionierte Variante Nik(MN) angelehnt ist, war in der Vergangenheit eine Möglichkeit geschaffen worden, beide Komponenten gemeinsam aus Membranen zu isolieren (Siche et al., 2010). Ein vierteiliger Cbi(MN)QO-Komplex war allerdings weiterhin nicht stabil, da CbiN offenbar die Interaktion von CbiM mit den übrigen Komponenten störte. Da CbiMN jedoch eine basale

Transportaktivität besitzt (Kirsch und Eitinger, 2014) und die Fusion zu Cbi(MN) keine Funktionseinschränkung des Transporters bewirkt (Siche et al., 2010), war Cbi(MN) geeignet, den Beladungsmechanismus von CbiM *in vitro* zu analysieren. Über den Einsatz von *continuous wave* (cw)-ESR-Spektroskopie wurde in Zusammenarbeit mit M. Sippach und Prof. Dr. H.-J. Steinhoff (AG Makromolekülstruktur, Uni Osnabrück) die Beladung der aus Membranen isolierten Proteine Cbi(MN) und CbiM mit Co^{2+} untersucht, das aufgrund seiner paramagnetischen Eigenschaften direkt nachweisbar ist. Als Negativkontrolle diente eine Variante von Cbi(MN), die aufgrund eines Austausches des His-2 am N-Terminus von CbiM gegen Aspartat kein vollständiges Ligandenfeld ausbilden kann und damit inaktiv ist (Siche et al., 2010). Der ESR-spektroskopische Nachweis musste aufgrund der sehr kurzen Spin-Gitter-Relaxationszeit im Niedrigtemperaturbereich bei 10 K und mit niedriger Mikrowellenleistung erfolgen (Hoffmann et al., 2013). Die isolierten Proteine wurden im 25-fachen molaren Überschuss mit CoCl_2 inkubiert und anschließend per cw-ESR-Spektroskopie untersucht (Abb. 30A).

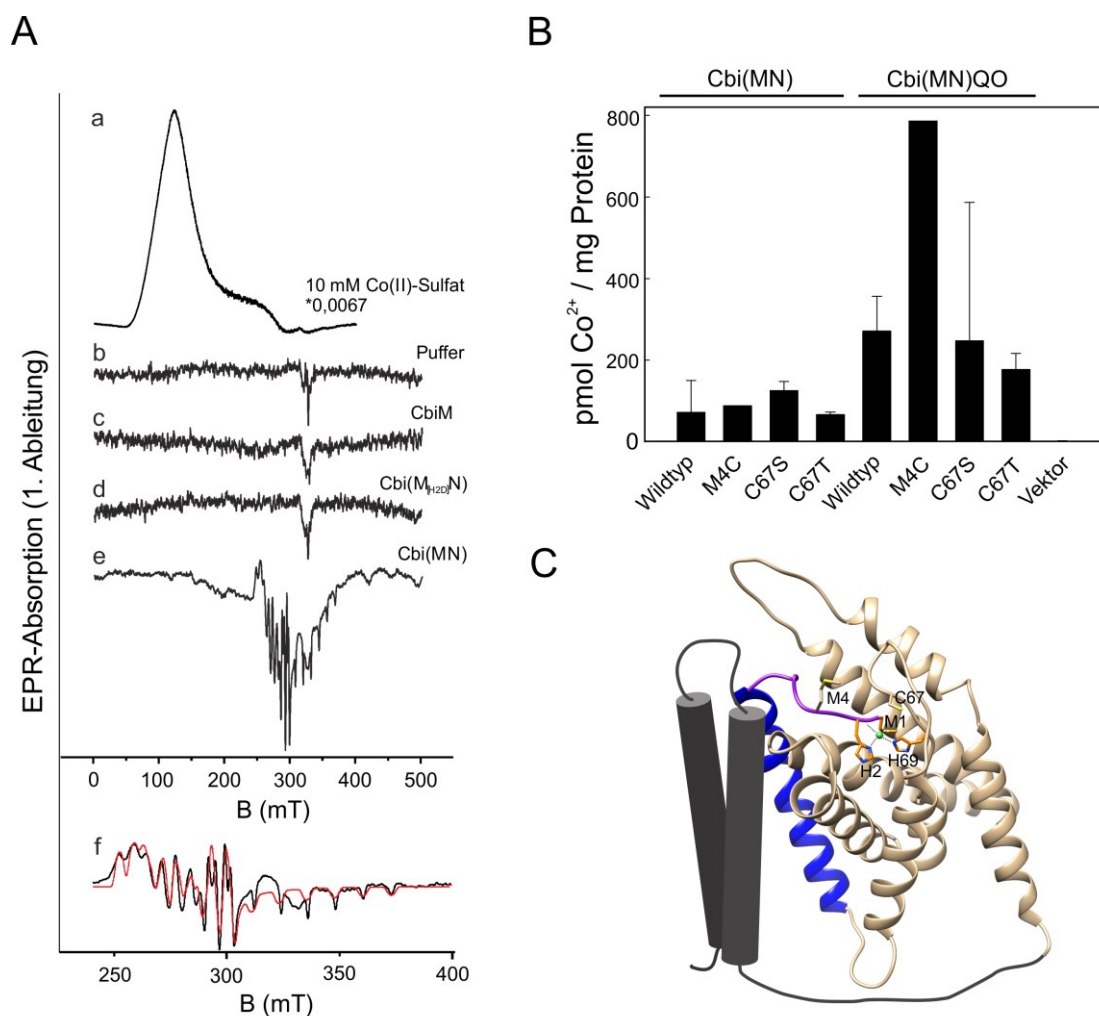


Abb. 30: Bindung von Cobalt an CbiM. A) Dargestellt sind die cw-ESR-Spektren von CoSO_4 (a), Co^{2+} -freiem Trispuffer (b), CbiM (c), Cbi($\text{M}_{[\text{H}_2\text{D}]}\text{N}$) (d) und Cbi(MN) (e) in 100 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 0,05 % DDM, 20 % Glycerin. Die Proteine wurden vor Aufnahme der Spektren *in vitro* mit Co^{2+} beladen. Die Messungen b) bis e) erfolgten bei 10 K und einer Mikrowellenleistung von 0,007 mW, die Messung a) bei 10 K und 10 mW. Die Amplitude dieses Spektrums wurde mit 0,0067 multipliziert. Das bei 328 mT sichtbare Signal in b) bis e) wurde durch die Quarz-Kapillare hervorgerufen. Die Überlagerung des basislinienkorrigierten Spektrums von Cbi(MN) mit einem simulierten Spektrum (rot) mit den g-Faktoren $g_x=2,38$, $g_y=2,39$ und $g_z=1,99$ und der Hyperfeinaufspaltung $A_x=5$ mT, $A_y=9$ mT, $A_z=12$ mT in (e) zeigt eine starke Übereinstimmung beider Spektren. Die Messungen und Simulation sowie die Erstellung der Abbildung erfolgten in Osnabrück durch M. Sippach, C. Herrmann und H.-J. Steinhoff. **B)** Dargestellt ist die Co^{2+} -Akkumulation durch *E. coli*-Zellen, die Varianten von Cbi(MN) oder Cbi(MN)QO produzierten. Nach 7-stündigem Wachstum in LB-Medium mit 500 nM $^{57}\text{CoCl}_2$ wurden die Zellen filtriert und die an den Filtern assoziierte Radioaktivität per Flüssigszintillation quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei Messungen mit Standardabweichung oder Einfachwerte. **C)** Schematische Darstellung einer möglichen Interaktion von RcCbiM mit den TMHs von CbiN (dunkelgrau) in der fusionierten Variante Cbi(MN). Die N-terminale Helix von CbiM ist blau, der konservierte N-Terminus lila und die an der Koordination von Co^{2+} (grün) beteiligten Aminosäuren sind orange hervorgehoben. Das Strukturmodell von RcCbiM ist durch F. Kirsch nach TtNikM2 (PDB-Code 4M58) mithilfe des SWISS-MODEL-Servers (Biasini et al., 2014) erstellt worden (Kirsch, 2015) und wurde für die Abbildung mit der Modellierungssoftware UCSF CHIMERA bearbeitet.

Das in Abb. 30A gezeigte Spektrum der Cbi(MN)-Probe zeigte gegenüber dem Puffer, CbiM oder der inaktiven Variante Cbi($\text{M}_{[\text{H}_2\text{D}]}\text{N}$) ein klares Kobalt-Signal. Durch die im Vergleich zum Spektrum des Kobalt-HexaquaKomplexes deutlich geringere Linienbreite war eine Auflösung der Hyperfeinaufspaltung möglich. Die Simulation des Spektrums ergab eine Summe der drei Hauptkomponenten des g-Tensors von 6,76 und damit einen typischen Wert für einen *low spin*-Kobalt-Komplex ($s=1/2$), der auf eine quadratisch-planare oder pseudo-tetraedrische Ligandierung hinweist (Hoffmann et al., 2013). Die Übereinstimmung des simulierten mit dem aufgenommenen Spektrum ließ zweifelsfrei auf eine Beladung von Cbi(MN) mit Co^{2+} rückschließen. Mit unvollständigem Ligandenfeld bei Cbi($\text{M}_{[\text{H}_2\text{D}]}\text{N}$) oder fehlender CbiN-Komponente konnte CbiM offenbar nicht mit Kobalt beladen werden. Der direkte Nachweis des CbiM-gebundenen Kobalts zeigt, dass CbiN für die Substratbeladung von CbiM essentiell ist.

Um Informationen über die Positionierung des N-Terminus in Abhängigkeit vom Beladungszustand zu gewinnen, sollen in zukünftigen Arbeiten ESR-basierte Abstandsanalysen folgen. Nach Spinmarkierung des N-Terminus und des natürlichen Cys-67 im Inneren von CbiM sollen einerseits Interaktionen des Nitroxid-Spinlabels mit Co^{2+} und andererseits

Interaktionen der Spinlabel untereinander zur Ermittlung von Abständen herangezogen werden. Aufgrund der strengen Konservierung der Aminosäurereste Met-1, His-2, Ile-3, Glu-5, Gly-6, Leu-8 in CbiM kam für das Einfügen eines Cysteinrestes zur Spinmarkierung am ehesten Position Met-4 infrage, an der natürlicherweise Variationen existieren und Austausche gegen Alanin und Serin toleriert worden waren (Siche et al., 2010). So hatte auch das Einfügen eines Cysteinrestes an dieser Position keinen negativen Einfluss auf die Funktion des Proteins, wie die Akkumulation von radioaktivem $^{57}\text{Co}^{2+}$ durch rekombinante *E. coli*-Zellen zeigte (Abb. 30B). Um die störungsfreie Interaktion zwischen einem Spinlabel an Position 4 und dem freien Spin des gebundenen Co^{2+} für eine Abstandsanalyse aufnehmen zu können, musste eine Variante ohne das intrinsische Cys-67 hergestellt werden. Ein Austausch gegen Serin oder Threonin hatte keinen Effekt auf die Aktivität und war daher für solche Untersuchungen geeignet (Abb. 30B). Diese Transporter-Varianten stellen eine wertvolle Basis für die Untersuchung des Beladungsmechanismus von CbiM dar, da sie eine Positionsbestimmung des Kobaltions und des N-Terminus an isoliertem Cbi(MN) ermöglichen. Die Analyse von Helix-Helix-Interaktionen zwischen CbiN und CbiM in Abhängigkeit vom Beladungszustand soll in zukünftigen Arbeiten die Rolle von CbiN näher beleuchten.

3. Diskussion

3.1 Biotin und Biotintransport

Biotin (Vitamin H/B₇) wird in allen Domänen des Lebens als essentieller Kofaktor von Enzymen benötigt, die in Transferreaktionen von Carboxylgruppen involviert sind. Als prosthetische Gruppe ist es mit der *Biotin-Carboxyl-Carrier*-Domäne (BCCP) der Acetyl-CoA-Carboxylase verknüpft, die durch Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA die ersten Schritte der *de novo*-Fettsäuresynthese katalysiert. Bei Säugetieren existieren fünf biotinabhängige Carboxylasen und eine Rolle in der epigenetischen Chromatinregulation über Biotinylierung von Histonproteinen wird diskutiert (Zempleni und Kuroishi, 2012; Zempleni et al., 2014). Da nur Pflanzen, Pilze und Prokaryoten die Fähigkeit besitzen, Teilschritte oder die vollständige Synthese von Biotin zu katalysieren, ist ein Großteil der Organismen auf die Aufnahme von Biotin aus der Umgebung angewiesen (Lin und Cronan, 2011). Säugetiere importieren durch die Nahrung zugeführtes Biotin über den natriumabhängigen Multivitamintransporter SMVT1, der in verschiedenen Gewebetypen vorkommt und den Transport von Biotin, Pantothenat und Liponsäure an den Natriumeinstrom koppelt (Quick und Shi, 2015; Said, 2009). SMVT1 besitzt 12 vorhergesagte Membranhelices und gehört zur Familie der natriumabhängigen Glukosetransporter, seine Affinität für Biotin liegt im niedrigen mikromolaren Bereich (Prasad et al., 1999; Prasad et al., 1998). In lymphatischen Zellen und Keratinocyten ist außerdem der Monocarboxylattransporter MCT1 am Biotinimport beteiligt (Daberkow et al., 2003). In *Arabidopsis thaliana* wurde Biotintransport über den Saccharose-H⁺-Symporter SUC5 nachgewiesen, der zur Familie der Saccharose/Monosaccharid-Transporter gehört und den Transport sekundär aktiv an den Einstrom von Protonen koppelt (Ludwig et al., 2000). Wie SMVT1 besteht AtSUC5 aus 12 mutmaßlichen Membranhelices. Untersuchungen eines pflanzlichen Zuckertransporters aus *Plantago major* (PmSUC2) deuten darauf hin, dass der Biotintransport eine generelle Eigenschaft dieser Transporterfamilie sein könnte (Ludwig et al., 2000). Obwohl keine kinetische Charakterisierung des Biotintransports durch Saccharose-H⁺-Symporter vorliegt, lassen Experimente mit biotinauxotrophen Hefezellen eine hohe Affinität, d.h. eine Funktion bei nanomolaren Biotinkonzentrationen vermuten (Ludwig et al., 2000). Aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sind ebenfalls protonenabhängige Biotintransporter bekannt, die wie SMVT1 und

pflanzliche Biotintransporter aus 12 vorhergesagten Membranhelices bestehen, mit diesen jedoch keine Verwandtschaft besitzen (Stolz, 2003; Stolz et al., 1999).

E. coli besitzt sowohl die Fähigkeit zur Produktion als auch zur Aufnahme von Biotin. Der Syntheseweg umfasst sechs Enzyme und ist mit einem Energieverbrauch von 20 ATP-Molekülen pro Biotinmolekül kostspielig und daher streng reguliert. Regulatorische Elemente steuern nicht nur die Biotinsynthese, sondern in einigen Organismen auch die Produktion von Biotintransportern (Feng et al., 2013; Piffeteau und Gaudry, 1985; Rodionov und Gelfand, 2006). Bei Mitgliedern der *Bacilli/Clostridia*, einigen Archaeen und etlichen Proteobakterien, darunter *E. coli* und andere Enterobakterien, spielt das bifunktionelle Enzym BirA eine entscheidende Rolle. BirA katalysiert über seine Biotin-Protein-Ligase (BPL)-Domäne die Verknüpfung der Valerylseitenkette von Biotin mit dem konservierten Lysinrest des BCCP und ist über die DNA-bindende, N-terminale Domäne regulatorisch wirksam (Bower et al., 1995; Cronan, 1989; Satiaputra et al., 2016). Der Wechsel zwischen enzymatischer und regulatorischer Aktivität wird durch die Verfügbarkeit von Apo-BCCP, dem Substrat von BirA, und Biotinyl-5'-AMP, einem Intermediat der Protein-Biotinylierung, gesteuert (Satiaputra et al., 2016). Die Konzentration von Biotinyl-5'-AMP korreliert positiv mit der Biotinkonzentration. In hohen Mengen fördert das aktivierte Biotin die Dimerisierung von BirA, wodurch dessen konserviertes Helix-turn-Helix-Motiv der N-terminalen Domäne an die Operatorsequenz (*bioO*) des *bio*-Operons binden kann und die Transkription reprimiert (Kwon und Beckett, 2000). Den BirA-Proteinen der α -Proteobakterien fehlt diese regulatorische Domäne, deren Funktion dort von BioR, einem GntR-ähnlichen Transkriptionsfaktor, übernommen wird (Feng et al., 2013; Rodionov und Gelfand, 2006). BioR ist nicht direkt von Biotin abhängig, sondern wird vermutlich über BirA gesteuert (Satiaputra et al., 2016). Bei einigen Mitgliedern der *Actinobacteria* werden Biotintransporter durch BioQ, einen Transkriptionsregulator der TetR-Familie, reguliert (Brune et al., 2012; Tang et al., 2014).

In Prokaryoten existieren nach heutigem Kenntnisstand mindestens zwei grundlegend verschiedene Biotinaufnahmesysteme. Bereits in den 1970er Jahren waren in Pionierarbeiten zum Biotinmetabolismus in *E. coli* K-12 drei Kandidatengene für einen hochaffinen Transporter in der Region zwischen dem *ilv*-Operon und *metR* eingegrenzt worden (Prakash und Eisenberg, 1974). Trotz intensiver Forschung durch verschiedene Gruppen dauerte es fast vier Jahrzehnte, bis das für den Transporter codierende Gen *yigM* eindeutig identifiziert wurde (Ringlstetter, 2010). YigM besitzt eine Halbsättigungskonstante von 74 ± 14 nM und wird der Familie der

sekundären Carboxylat/Aminosäure/Amin-Transporter zugeordnet; der Transportmechanismus ist jedoch bisher unbekannt (Ringlstetter, 2010). Da eine direkte Abhängigkeit des aus 10 Transmembrandomänen bestehenden Proteins von ATP oder einem Protonengradienten nicht nachgewiesen werden konnte, wurde von einem Mechanismus der erleichterten Diffusion ausgegangen. Prakash und Eisenberg hatten beobachtet, dass der Biotintransport in *E. coli* erst bei höheren Biotinkonzentrationen reprimiert wird als die Biotinsynthese, die bereits ab 20 nM Biotin im Medium nahezu vollständig gehemmt ist (Prakash und Eisenberg, 1974). Da der *yigM*-Promotor eine unvollständige BirA-Bindestelle enthält, könnte eine schwächere Repressorbindung für die weniger ausgeprägte Hemmung verantwortlich sein, die somit bei Inaktivierung der Synthese noch einen effektiven Biotinimport zulässt (Ringlstetter, 2010). In etlichen anderen Enterobakterien wie *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Klebsiella* und *Citrobacter* existieren Homologe von YigM, die dort vermutlich ebenfalls für die Biotinaufnahme verantwortlich sind (Ringlstetter, 2010).

Weiter verbreitet sind bei Prokaryoten allerdings *Energy-Coupling Factor* (ECF)-Transporter (Rodionov et al., 2009). ECF-Transporter sind ABC-Transporter, die sich modular aus einem zentralen Membranprotein (EcfT), zwei ATPasen (EcfA1, EcfA2) und einer substratspezifischen Membrankomponente (EcfS) zusammensetzen (Eitinger et al., 2011; Slotboom, 2014). Die Analyse von über 300 in der SEED-Datenbank hinterlegten prokaryotischen Genomen hatte über 21 Familien von S-Einheiten mit unterschiedlichen Substratspezifitäten offenbart, von denen die biotinspezifische S-Einheit BioY die häufigste war (Rodionov et al., 2009). Die Mitglieder der BioY-Familie (pfam02632) sind phylogenetisch weit verbreitet und funktionell divers organisiert (Hebbeln et al., 2007; Rodionov et al., 2009). BioY-Proteine, die ECF-Transportern der Subklasse I zugeordnet werden, sind vorrangig in Proteobakterien, Actinobakterien und Archaeen zu finden und stets mit dem Energetisierungsmodul aus A- (BioM) und T-Komponente (BioN) assoziiert, die auch gemeinsam codiert werden. ECF-Transporter der Subklasse II, bei denen unterschiedliche S-Einheiten mit einem EcfA1A2T-Modul interagieren, existieren vermehrt in *Firmicutes* (Rodionov et al., 2009), die fast ausschließlich biotinauxotroph und damit auf den Import von Biotin angewiesen sind (Magnúsdóttir et al., 2015). S-Einheiten von Transportern dieser Subklasse werden separat vom EcfA1A2T-Modul codiert und die *bioY*-Gene unterliegen fast ausnahmslos der Regulation durch BirA (Hebbeln et al., 2007). Da bei Transportern der Subklasse II bis zu elf verschiedene Substrate über ihre jeweiligen S-Einheiten gebunden und mithilfe eines zentralen Energetisierungsmoduls importiert werden, ist eine Regulation der

einzelnen S-Komponenten in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit ihrer Substrate energetisch sehr sinnvoll. BioY nimmt unter den S-Einheiten eine Sonderrolle ein, da etwa ein Drittel aller bisher identifizierten *bioY*-Gene in Genomen vorkommen, die keine erkennbaren Gene für A- und T-Komponenten aufweisen. Ein derartiges, solitäres Vorkommen ist auf α -Proteobakterien, Cyanobakterien und einige Mitglieder der Actinobakterien und *Chlamydiae* beschränkt und ist von anderen S-Einheiten nicht bekannt (Eitinger et al., 2011). Da einige dieser Organismen (hauptsächlich Actinobakterien und Mitglieder der Gattung *Chlamydia*) keinen bzw. keinen vollständigen Syntheseapparat für Biotin besitzen (Magnúsdóttir et al., 2015), wurde eine Transportfunktion der solitären BioY-Proteine diskutiert, die von A- und T-Komponenten unabhängig ist (Hebbeln et al., 2007).

3.2 Solitäre BioY-Proteine als funktionelle Biotintransporter

In der hier vorliegenden Arbeit wurde mithilfe eines biotinauxotrophen und intrinsisch -transportdefizienten Referenzstammes erstmals gezeigt, dass solitäre BioY-Proteine tatsächlich funktionelle hochaffine Biotintransporter sind, die kein EcfA1A2T-Modul benötigen. Der *E. coli*-Stamm, in dem die Biotinsynthese durch Deletion von *bioH* und der hochaffine Biotinimport durch Deletion von *yigM* inaktiviert wurden, war ohne einen rekombinanten Biotintransporter nicht mehr in der Lage, unter Biotinmangel (1 nM) zu wachsen. Im Gegensatz zur Akkumulation von radioaktivem Biotin durch Transporter produzierende Zellen lieferte diese Methode einen eindeutigen Nachweis einer Transportfunktion in die Zellen, da das Wachstum des Stammes von der Biotinaufnahme abhing. Da der Indikatorstamm bei höheren Biotinkonzentrationen auch ohne hochaffinen Transporter wuchs, ist davon auszugehen, dass *E. coli* mindestens einen weiteren Biotintransporter mit niedrigerer Affinität besitzt. Diese Redundanz bestätigte frühere Beobachtungen mit biotindefizienten Zufallsmutanten, die von einer erhöhten Biotinverfügbarkeit abhingen (Campbell et al., 1980). Acht BioY-Proteine aus den α -Proteobakterien *Bradyrhizobium japonicum*, *Roseobacter denitrificans*, *Roseovarius nubinhibens*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Oceanicola batsensis* und *Silicibacter pomeroyi*, die natürlicherweise keine A- und T-Komponenten besitzen, erlaubten dem Referenzstamm nach ihrer rekombinanten Produktion das Wachstum auf 1 nM Biotin und gaben sich dadurch als hochaffine Biotintransporter zu erkennen (Abb. 11C). Typisch für γ -Proteobakterien besitzen auch *E. coli* K-12 und dessen Deivate keine ECF-Transporter (Rodionov et al., 2009), sodass eine Interaktion der rekombinanten BioY-Proteine mit intrinsischen ECF-Komponenten

auszuschließen ist. Eine Transportfunktion war auch für das solitäre *RcBioY*, die S-Einheit des biotinspezifischen ECF-Transporters der Subklasse I aus *R. capsulatus* (Hebbeln et al., 2007), und *CtBioY* aus *Chlamydia trachomatis*, in dessen Genom keine *ecfA*- und *ecfT*-Gene vorkommen (Fisher et al., 2012), vorgeschlagen worden. Chlamydien sind obligat intrazellulär parasitäre Bakterien, die sich nach Internalisierung durch eukaryotische Zellen in Einschlusskörperchen reproduzieren (Abdelrahman und Belland, 2005). Dass solitäres BioY in *Chlamydia* als Biotintransporter fungieren könnte, wurde durch den Nachweis des eukaryotischen Biotintransporters SMVT1 in den Einschlusskörperchen untermauert. Im Zusammenspiel beider Systeme könnte die beschriebene Affinität von BioY im niedrigen nanomolaren Bereich ($K_m = 3,35 \text{ nM}$) ausreichen, um gemeinsam mit dem weniger affinen Transporter SMVT1 ($K_m = 15,1 \text{ }\mu\text{M}$) einen Nettoimport von Biotin aus den Wirtszellen in die Retikularkörper (RB) der Chlamydien zu katalysieren (Fisher et al., 2012). Die drei BioY-Proteine aus *R. capsulatus*, *A. tumefaciens* und *S. meliloti*, die allesamt zu ECF-Transportern der Subklasse I gehören, waren im Referenzstamm ohne BioM₂N jedoch nicht in der Lage, einen messbaren Biotintransport zu vermitteln. Ein mit hochaffinem Biotintransport verbundenes Wachstum auf 1 nM Biotin war nur unter Expression des vollständigen *bioMNY*-Operons möglich (Abb. 18). Dass *RcBioY* ohne Energetisierungsmodul (BioM₂N) einen Biotintransporter darstellen könnte, war bereits aufgrund der Kinetik der Biotinanreicherung durch *RcBioY* in Liposomen angezweifelt worden, die eher auf eine Bindung hingewiesen hatte (Berntsson et al., 2012).

Ob *RcBioY*, *AtBioY* und *SmBioY* tatsächlich nur Biotin binden oder aber einen basalen Transport mit niedriger Affinität katalysieren, war mithilfe dieses Systems nicht differenzierbar. Zur hochaffinen Biotinaufnahme waren diese drei BioY-Proteine jedoch nur in der Lage, wenn sie im Komplex mit BioMN vorlagen, während die acht immer solitär vorkommenden Proteine *BjBioY*, *RdBioY*, *RnBioY*, *RpBioY*, *ObBioY*1/2 und *SpBioY*1/2 offensichtlich ohne diese Komponenten hochaffine Transporter darstellen. Unter der Berücksichtigung, dass ECF-Transporter und die Biotinsynthese ATP (Lin und Cronan, 2011) konsumieren und die jeweiligen Operons bedarfsabhängig reguliert werden (Satiaputra et al., 2016), kann angenommen werden, dass ein Unterschied zwischen solitären BioY-Proteinen und BioM₂NY hinsichtlich ihrer Affinität existieren muss, der den Energiebedarf rechtfertigt. Andernfalls wäre es fraglich, warum Organismen energieverbrauchende Transporter nutzen, wenn ein Biotinimport mit hinreichender Affinität auch ohne ATP-Verbrauch möglich ist. Ein Transport in den Referenzstamm wurde nur bis zu einer minimalen Konzentration von 1 nM Biotin

getestet und es müsste weitergehend untersucht werden, ob bei niedrigeren Konzentrationen Unterschiede zwischen solitärem BioY und BioM₂NY hinsichtlich der Affinität bestehen. Da die Organismen, aus denen diese Proteine stammen, teils in marinen, teils in terrestrischen oder aber in beiden Habitaten vorkommen, ist ihre natürliche Biotinverfügbarkeit schwer zu beurteilen. Mitglieder der *Rhizobiales*, zu denen *A. tumefaciens*, *S. meliloti* und *Rhizobium etli*, aber auch *B. japonicum* zählen, sind häufig mit Leguminosen vergesellschaftet und die Ausbildung der Symbiose, die zur Knöllchenbildung an den Wurzeln führt, ist nachweislich stark biotinabhängig (Guillén-Navarro et al., 2005). Obwohl Biotin über die Wurzeln von Leguminosen ausgeschüttet wird, scheint die Biotinkonzentration in der Wurzelregion niedrig zu sein. Wachstumsdaten verschiedener *Rhizobia*-Stämme deuten auf die Notwendigkeit eines sehr affinen und effektiven Biotinimports hin, der dem Bedarf für bis zu vier biotinabhängigen Carboxylasen in diesen Organismen Rechnung trägt (Dunn et al., 2002). Wie *S. meliloti* und *A. tumefaciens* nutzt auch *R. etli* BioM₂NY für den Biotinimport (Guillén-Navarro et al., 2005). Solitäre BioY-Proteine kommen dagegen hauptsächlich in Cyanobakterien und α -Proteobakterien vor (Hebbeln et al., 2007), die vorrangig aquatische Lebensräume besiedeln (Brenner et al., 2005). In küstennahen Gewässern und marinen Oberflächenschichten wurden hohe Biotinkonzentrationen von bis zu 237 pM nachgewiesen, die saisonal schwanken und mit Phytoplankton assoziiert sind (Ohwada, 1972). Es ist daher vorstellbar, dass eine hohe Biotinverfügbarkeit zum Erhalt eines möglicherweise weniger affinen aber weniger Energie konsumierenden Transportsystems geführt haben könnte, das dem Bedarf dieser Organismen genügt. Einige Cyanobakterien besitzen allerdings einzelne Gene, die für T-Komponenten codieren. Obwohl der genomische Kontext dieser Gene nicht auf eine Involvierung in Transportprozesse hindeutet, kann eine Interaktion dieser EcfT-Proteine mit BioY und damit eine Beteiligung am Transport bei Cyanobakterien nicht ausgeschlossen werden (Eitinger et al., 2011).

3.3 Die S-Einheit als zentrales Element im Mechanismus von ECF-Transportern

Zur Klärung der Substratspezifität von S-Einheiten und ihrer möglichen Aktivität im solitären Zustand wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen *E. coli*-Stämme verwendet, die auxotroph für das jeweils vermutete Substrat waren und keine intrinsischen Transporter dafür besaßen. In diesen Stämmen wurde die jeweilige S-Einheit sowohl mit als auch ohne das ECF-Modul produziert. Wachstum auf Minimalmedium, dem das essenzielle Testsubstrat in

Spurenkonzentration zugesetzt war, gab Auskunft über eine Transportaktivität. S-Einheiten für Folat (Erkens et al., 2011; Neubauer et al., 2009), Pantothenat (Neubauer et al., 2009; Zhang et al., 2014), Thiamin und Riboflavin (Rodionov et al., 2009; Zhang et al., 2010) waren dabei stets auf ihre A- und T-Komponenten angewiesen. Neben den solitär funktionellen BioY-Proteinen waren jedoch auch die metallspezifischen S-Einheiten CbiM und NikM aus *R. capsulatus* zum basalen Transport ohne EcfA1A2T-Modul (Cbi/NikQO₂) in der Lage, wenn gleichzeitig die kleine Transporter-Komponente (Cbi/NikN) vorhanden war (Kirsch und Eitinger, 2014). Anders als bei dem oben erläuterten Verfahren wurde zur Prüfung der Nickel-Transportaktivität nicht das Wachstum eines Indikatorstammes verfolgt, sondern die Aktivität einer intrazellulären und nickelabhängigen Urease herangezogen, die zusammen mit den Cbi/Nik-Komponenten rekombinant produziert worden war.

Angesichts der konservierten Topologie von S-Einheiten stellt sich die Frage nach möglichen strukturellen Ursachen für diesen funktionellen Unterschied, der solitäre BioY-Proteine und metallspezifische S-Einheiten offenbar von anderen S-Einheiten abgrenzt. Mit Ausnahme der metallspezifischen S-Einheiten besitzen S-Komponenten sechs transmembrane Helices und insgesamt eine vergleichbare Topologie, die auch für strukturell nicht charakterisierte S-Einheiten vorhergesagt wurde (Rodionov et al., 2009; Rodionov et al., 2006; Zhang, 2013). CbiM und NikM sind insofern außergewöhnlich, als sie eine zusätzliche membrandurchspannende Helix am N-Terminus tragen, deren Amino-Ende von außen in die Metallbindetasche ragt und mit den ersten beiden hoch konservierten Aminosäuren (Met-1 und His-2) drei der vier Metallliganden liefert (Siche et al., 2010; Yu et al., 2014) (Abb. 30C). Die Kristallstruktur von mit Ni²⁺ oder Co²⁺ beladenem TtNikM2 (pdb-Codes 4M58/4M5B und 4M5C) hatte den Aufbau der quadratisch planaren Bindestelle gezeigt, die sich aus der Aminogruppe des Met-1, dem Nδ1-Atom des Imidazolringes und dem Peptidstickstoff des His-2 sowie dem Nε2-Atom eines weiteren Histidinrestes in der ersten extrazellulären Schleife (zwischen TMH2 und TMH3) zusammensetzt (Yu et al., 2014). Die stabile Positionierung des N-Terminus wird durch Wasserstoffbrücken und Koordination der Seitenkette des Met-1 gewährleistet. Eine Erklärung, wie sowohl BioY als auch CbiM und NikM ihre Substrate über die Membran befördern, könnten Oligomere liefern, die für BioY aus *R. capsulatus* (Finkenwirth et al., 2010; Hebbeln et al., 2007; Kirsch et al., 2012), für BioY aus *C. trachomatis* (Fisher et al., 2012) und für die solitären BioY-Varianten der α-Proteobakterien *B. japonicum*, *R. denitrificans*, *R. nubinhibens*, *R. palustris*, *O. batsensis* und *S. pomeroyi* (Kirsch, 2015) beobachtet worden waren. Darüber hinaus waren mit Ausnahme von TtNikM2 und BsYkoE

(pdb-Code 5EDL) (Josts et al., 2016) alle kristallisierten S-Einheiten in den asymmetrischen Einheiten ihrer Kristalle als Dimer oder Trimer vorhanden, was aufgrund der ungewöhnlichen Anordnung der Proteine allerdings als nicht vereinbar mit der Membran und damit als Artefakt interpretiert worden war. Unter Berücksichtigung der Orientierung, die S-Einheiten in den Strukturen der Holotransporter einnehmen, müssten diese Oligomere jedoch neu bewertet werden. Zwar hatte *RcBioY* im Indikatorstamm keine nachweisliche Transportfunktion ohne *BioM₂N* gezeigt, die Bildung von Homodimeren könnte jedoch Ausdruck einer intrinsischen Veranlagung zur Komplexbildung mit einem Interaktionspartner sein, den natürlicherweise die T-Komponente darstellt. Analog zum Kippmechanismus der S-Einheiten in den Holotransportern (Zhang, 2013), der in der vorliegenden Arbeit anhand von *RcBioY* im *BioM₂NY*-Komplex erstmals experimentell untermauert wurde, könnte eine Dimerisierung von *BioY* ein Umklappen in der Membran begünstigen. Beim Kippen der metallspezifischen S-Einheiten könnte die jeweilige kleine transmembrane Komponente *CbiN* bzw. *NikN* als Interaktionspartner dienen. Diese sind für die Transportfunktion sowohl der Holotransporter (*CbiMNQO/NikMNQO*) als auch der Basiskomponenten (*CbiMN/NikMN*, in Abwesenheit des ECF-Moduls *CbiQO/NikQO*) zwingend erforderlich (Kirsch und Eitinger, 2014; Rodionov et al., 2006). Erstaunlich sind die Tatsachen, dass (i) *NikMN* häufig als natürliche Fusionen vorliegen, (ii) natürlicherweise sehr selten existierende *CbiMN*-Fusionen artifiziell zu funktionellen Einheiten verknüpft werden können, und (iii) die einzelnen N-Untereinheiten trotzdem nicht mit den MQO-Komplexen mitgereinigt werden und nach Fusion mit den M-Untereinheiten zur Destabilisierung der gesamten Transporter-Komplexe führen (Siche et al., 2010). Aufgrund dieser essentiellen, aber anscheinend nur transienten Interaktion war vermutet worden, dass *Cbi/NikN* eine entscheidende Rolle bei der Beladung der Substratbindestelle mit dem Metallion spielen könnte, indem es bei der Positionierung des N-Terminus hilft (Kirsch und Eitinger, 2014; Siche et al., 2010). Diese Rolle wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Beladung von isoliertem *CbiM* mit Kobalt nur nachweisbar war, wenn *CbiN* per Fusion gemeinsam mit *CbiM* aus Membranen isoliert wurde (Abb. 30A). Da *TtNikM2* jedoch trotz Abwesenheit von *NikN* mit gebundenem Substrat kristallisiert worden war (Yu et al., 2014), ist alternativ eine Funktion im Translokationsprozess vorstellbar. Ein mögliches Szenario, in dem die TMH1 eine Schlüsselrolle in der Interaktion mit *Cbi/NikN* spielen könnte, soll in zukünftigen Interaktionsstudien und strukturdynamischen Analysen beleuchtet werden. Ein Kippen von *Cbi/NikM* an *Cbi/NikN* könnte bei bestehender Interaktion der TMH1 mit *Cbi/NikN* zu einem Lösen des N-Terminus aus der Metallbindestelle führen, wodurch das Metallion aus seiner festen Bindung ins Zytoplasma entlassen werden würde.

Eine Oligomerisierung kleiner Membranproteine zur Vermittlung von Transport wäre nichts Ungewöhnliches. Für den *Multidrug*-Exporter EmrE aus *E. coli*, ein kleines Membranprotein mit vier Helices, das den Export einer weiten Palette polyaromatischer Substrate katalysiert, wurden Dimere vorgeschlagen, in denen zwei Monomere durch völlige Umkehr der Helices eine antiparallele Orientierung einnehmen (Morrison et al., 2011). Tatsächlich deuten Molekulardynamik (MD)-Simulationen der S-Einheit FolT aus *L. brevis*, deren Kristallstruktur liegend im Holotransporter entschlüsselt worden war (Wang et al., 2013), auf eine intrinsische Tendenz zum Kippen in der Membran hin (Wen und Tajkhorshid, 2014). Demnach kann *LbFolT* selbst ohne T-Komponente zwei stabile Konformationen in der Membran einnehmen, die sich um einen Winkel von etwa 50° voneinander unterscheiden. Zur Beantwortung der Frage, warum einige S-Einheiten nur in Kombination mit einer T-Komponente und andere alleine zum Transport in der Lage sein könnten, wäre demnach die Fähigkeit ausschlaggebend, ohne fremden Interaktionspartner (T-Komponente) die energetische Barriere des hydrophoben Membrankerns überwinden und so zwischen den beiden favorisierten Konformationen in der Membran wechseln zu können.

Abb. 31A zeigt ein Strukturalignment von Modellen für *RcBioY*, *AtBioY*, *SmBioY* und für die acht solitären BioY-Proteine *BjBioY*, *RdBioY*, *RnBioY*, *RpBioY*, *ObBioY1*, *ObBioY2*, *SpBioY1* und *SpBioY2*, die alle nach der Kristallstruktur von *LbBioY* (pdb-Code 4DVE) durch den Modellierungsserver SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014) generiert wurden. Die individuellen Strukturvergleiche des jeweiligen Modells mit der Matrize ergaben sehr niedrige RMSD-Werte von maximal 0,83 Å und eine vergleichbare Topologie ohne signifikante Strukturunterschiede. Wie bei den drei BioY-Proteinen der Subklasse I aus *R. capsulatus*, *A. tumefaciens* und *S. meliloti* ist auch die hochaffine Transportfunktion von *LbBioY*, das zu einem ECF-Transporter der Subklasse II gehört, von seinem EcfA1A2T-Modul abhängig (Kirsch, 2015). Die Aminosäuresequenzübereinstimmung dieser vier BioY-Proteine mit den acht solitär aktiven BioY-Proteinen liegt zwischen 14,89 und 32,42 %, während die acht solitären BioY-Varianten untereinander eine Übereinstimmung von 29,26 bis 73,63 % aufweisen. Dies deckt sich mit dem Ergebnis einer vergleichenden Sequenzanalyse von Mitgliedern der BioY-Familie, die durch Hebbeln et al. durchgeführt worden war und eine Korrelation der Sequenzähnlichkeit der BioY-Proteine mit ihrer genomischen Organisation (Subklasse I, II und solitär) offenbart hatte (Hebbeln et al., 2007). Demzufolge könnte die vergleichsweise hohe Sequenzübereinstimmung unter solitären BioY-Varianten Ausdruck einer Konservierung

bestimmter Struktureigenschaften sein, die für ihr solitäres Vorkommen und die solitäre Transportfunktion ursächlich sind.

Die Hetero- oder Homooligomerisierung innerhalb der Membran könnte allen S-Einheiten gemein sein. S-Einheiten von ECF-Transportern der Subklasse-II besitzen in der ersten Helix ein konserviertes Motiv aus kleinen hydrophoben Aminosäuren (Ala oder Val), die mit drei dazwischen liegenden beliebigen Aminosäuren ein hydrophobes Motiv auf einer Seite der Helix bilden und für die funktionelle Interaktion mit der T-Komponente von Bedeutung sind (Erkens et al., 2011; Zhang et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde je eine Variation dieses Motivs in der ersten Helix von *RcBioY* (A₁₂A₁₃xxV₁₆A₁₇), *AtBioY* (A₁₇xxxA₂₁) und *SmBioY* (A₁₄xxxA₁₈) identifiziert und gezeigt, dass diese Aminosäurereste dort ebenfalls in die Interaktion mit der T-Komponente (BioN) involviert sind. Ein Austausch von Ala-12 und Ala-13 in *RcBioY*, Ala-17 in *AtBioY* und Ala-14 in *SmBioY* gegen Tryptophan führte wie bei *LlThiT* und *LbPanT* zu einer signifikanten Störung der Interaktion mit der T-Einheit (Abb. 17) und in der Folge der Transportfunktion (Abb. 19). Ein Tryptophanaustausch an den Positionen Val-16 und Ala-17 bei *RcBioY*, Ala-21 bei *AtBioY* und Val-18 bei *SmBioY* wurde dagegen toleriert. Die chemische Quervernetzung eingefügter Cysteinreste an den Positionen 16 oder 17 in der TMH1 von *RcBioY* und an den Positionen 143 oder 147 in der zweiten Kopplungshelix (CH2) von *RcBioN* deutete auf eine enge Interaktion dieser hydrophoben Bereiche hin (Abb. 21 und Abb. 22). In Kenntnis aller bis jetzt bekannter 3D-Strukturen von S-Einheiten ist allerdings anzunehmen, dass das Interaktionsmotiv in BioY drei Positionen weiter in Richtung des N-Terminus verschoben liegen könnte (Abb. 40 im Anhang) als ursprünglich vorgeschlagen (Kiesler, 2013). Dies könnte erklären, warum ein Austausch der jeweils zweiten hydrophoben Aminosäure in den untersuchten Motive von *AtBioY* (Ala-21), *SmBioY* (Val-18) und *RcBioY* (Val-16 oder Ala-17) gegen Tryptophan keine signifikante Wirkung zeigte. Im BioM₂NY-Modell interagiert *RcBioY* im Sequenzbereich G₉xxA₁₂A₁₃ sehr eng mit der von CH2 und CH3 gebildeten Auflagefläche in *RcBioN*.

Am Beispiel der thiaminspezifischen S-Einheit YkoE aus *Bacillus subtilis*, die neben *TtNikM2* eine der beiden bisher kristallisierten S-Komponenten von Subklasse I-Transportern ist (pdb-Code 5EDL), war argumentiert worden, eine Koevolution von S- und T-Einheit würde eine Abweichung von einem strikten AxxxA-Motiv zulassen (Josts et al., 2016). Zwar ist das Argument überzeugend, dass Sequenz- und Strukturveränderungen durch Anpassungen im spezifischen Interaktionspartner kompensiert werden können, allerdings existieren auch bei S-

Einheiten von ECF-Transportern der Subklasse II aus *L. brevis* Variationen in diesem Motiv (Zhang et al., 2014). Aus den Kristallstrukturen der ECF-Holotransporter wurde abgeleitet, dass die Kontaktbereiche im Wesentlichen einerseits eine hydrophobe Rinne zwischen TMH1 und TMH3 der S-Einheit umfassen, in der die CH3 der T-Komponente liegt, und andererseits das hydrophobe Motiv in der TMH1 der S-Einheit, das mit der CH2 der T-Einheit interagiert (Zhang et al., 2014). Aufgrund von Variationen in diesem hydrophoben Motiv war daher vermutet worden, dass dieser Bereich selbst keine spezifische Funktion einnimmt, sondern vielmehr im Kontext der beschriebenen umfangreichen Kontaktfläche zwischen S- und T-Einheit einen Beitrag zur Komplexbildung verschiedener S-Komponenten mit dem EcfA1A2T-Modul leistet (Zhang et al., 2014). Da die letztgenannte Interaktion in der vorliegenden Arbeit auch an BioM₂NY experimentell nachgewiesen wurde, wird deutlich, dass es sich dabei nicht um ein Schlüsselmerkmal von ECF-Transportern der Subklasse II handelt. Die Bedeutung kleiner hydrophober Aminosäuren in diesem Bereich wird durch die Beobachtung untermauert, dass Valinaustausche an den Positionen 12, 13 und 16 in RcBioY keinen Einfluss auf die Interaktion mit BioN und die Transportfunktion hatten (Kiesler, 2013). Vergleichbare hydrophobe Motive (wie GxxxG) kommen in Membranproteinen sehr häufig vor, da mehrere hydrophobe Aminosäuren auf der gleichen Seite einer Membranhelix eine dichte Zusammenlagerung mit anderen Helices erlauben und damit Stabilität gewähren (Cymer et al., 2012; Kleiger et al., 2002). Aus dem Aminosäuresequenzvergleich ausgewählter BioY-Varianten in Abb. 41 im Anhang geht hervor, dass Variationen eines solchen Motivs auch in der ersten Helix der acht solitären BioY-Proteine vorkommen (orange in Abb. 31A), und zukünftige Arbeiten sollen Informationen dazu liefern, ob diese Aminosäurereste in eine BioY-BioY-Interaktion involviert sind, die den BioY-Proteinen analog zum postulierten Mechanismus im Holotransporter ein Kippen ermöglichen könnten (Abb. 31B).

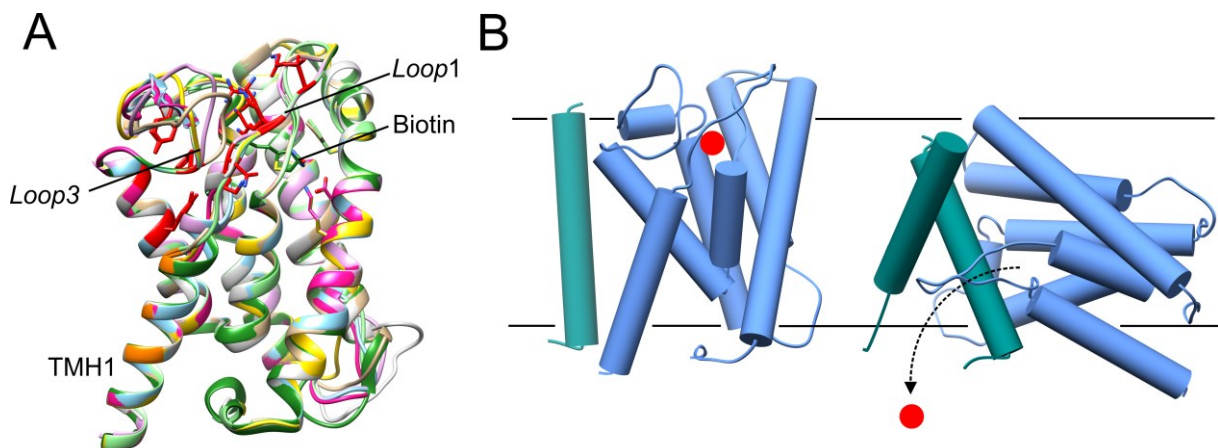


Abb. 31: Strukturmodelle und Transportmodell solitärer BioY-Proteine. **A)** Strukturalignment der in dieser Arbeit untersuchten solitären BioY-Proteine mit *L/BioY*. Die Strukturmodellierung erfolgte mithilfe des SWISS-MODEL-Servers nach *L/BioY* (grün) (pdb-Code 4DVE). Die Positionen kleiner hydrophober Aminosäurereste in TMH1 sind orange markiert und Aminosäurereste, die nur in den solitären BioY-Proteinen konserviert sind, wurden rot eingefärbt. **B)** Schematische Darstellung eines hypothetischen Kippmechanismus solitärer BioY-Proteine. Durch Interaktion zweier BioY-Proteine könnte eine Einheit (blau) am homologen Interaktionspartner (türkis) umkippen und dabei das Substrat (rot) in die Zelle befördern. Die Abbildungen wurden mit der Visualisierungssoftware UCSF CHIMERA (Pettersen et al., 2004) erstellt.

Transport ist nur dann möglich, wenn das mit hoher Affinität an die S-Einheit gebundene Substrat wieder abgegeben werden kann. Bei der Substratfreisetzung durch solitäre BioY-Proteine könnten die erste und dritte extrazelluläre Schleife eine Rolle spielen. ESR-basierte Abstandsmessungen innerhalb von ThiT aus *L. lactis* hatten gezeigt, dass mit der Thiaminbindung hauptsächlich strukturelle Veränderungen der extrazellulären *Loop*-Regionen einhergehen (Majsnierowska et al., 2013). Zum gleichen Ergebnis führte ein struktureller Vergleich einer substratgebundenen mit einer substratfreien FolT-Variante, und es wurde ein *Gating*-Mechanismus vorgeschlagen, der durch Öffnen der *Loops* 1 und 3 zur Freisetzung des Substrates ins Zytosol führt (Zhao et al., 2015). In der Kristallstruktur von *L/BioY* (pdb-Code 4DVE) bilden ein Amid und eine Carbonylgruppe im Peptidrückgrat des *Loop* 1 (I₃₈I₃₉) Wasserstoffbrücken mit der Carbonylgruppe und dem N2-Atom des Ureidoringes von Biotin, und mehrere Seitenketten des *Loop* 3 koordinieren die terminale Carboxylgruppe (Berntsson et al., 2012). Solitäre BioY-Proteine enthalten im Bereich des *Loop* 3 mit Glycin, Phenylalanin und Tyrosin stark konservierte hydrophobe Aminosäurereste (rot in Abb. 31A), die auf eine dichte Packung dieser Schleife hinweisen. Gleichzeitig enthalten die *Loops* 1 und 3 einiger solitärer BioY-Proteine auffällig viele polare oder geladene Seitenketten (Gln, Asn, Glu, Lys, ebenfalls rot in Abb. 31A). Es ist vorstellbar, dass durch Umkippen eines BioY-Proteins an einem homologen Interaktionspartner eine Störung der dichten Packung der *Loops* 1 und 3 bewirkt wird, die zum Zerreißen der Bindestelle und damit Freisetzung von Biotin führen könnte. Dabei könnte eine Abstoßung zwischen den Seitenketten in den Schleifen und der hydrophoben Membrenumgebung von Bedeutung sein. Um belastbare Aussagen über die strukturelle und funktionelle Relevanz konservierter Reste treffen zu können, sind jedoch Struktur- und Aktivitätsdaten zu entsprechenden Austauschvarianten nötig. Bisher verfügbare Kristalle der beiden solitären BioY-Proteine aus *O. batsensis* (*ObBioY2*) und *R. palustris* (*RpBioY*) lieferten allerdings nur unzureichende Röntgenbeugungsdaten, um die Raumstrukturen zu lösen. In vorangegangenen Untersuchungen war beobachtet worden, dass

Biotin Einfluss auf den Oligomierzustand von gereinigtem *RcBioY* in Detergenzlösung hat; es bewirkt eine Erhöhung des Monomeranteils relativ zum Dimer (Kirsch, 2015). Es wurde daher versucht und wird in weiteren Experimenten weiter versucht werden, monodisperse BioY-Formen in Gegenwart oder Abwesenheit von Biotin zu erhalten. Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen durch Anpassung der Proteinkonzentration und Zugabe von Additiven ist geplant.

3.4 Die Rolle von ATP im Transportmechanismus von BioM₂NY

Dem Kippmodell zufolge muss die S-Einheit von ECF-Transportern nach Substratabgabe in das Zytoplasma wieder aufgerichtet werden, damit die Substratbindestelle von außen zugänglich wird und erneut Substrat gebunden werden kann. Die Idee einer umklappenden S-Einheit war zu Beginn dieser Arbeit rein hypothetisch und basierte allein auf zwei Kristallstrukturen von ECF-Transportern für Folat (Xu et al., 2013) und Pyridoxamin (Wang et al., 2015; Wang et al., 2013) aus *L. brevis*, die im ATP- und substratfreien Zustand mit nach innen gerichteter Bindestelle kristallisiert worden waren. Mittlerweile sind zwei weitere Strukturen bekannt, die dieses Modell unterstützen (Swier et al., 2016; Zhang et al., 2014). Dass ATP die Aufrichtung der S-Einheiten antreiben könnte, war im Wesentlichen eine Hypothese in Analogie zu kanonischen ABC-Importern (Zhang, 2013), bei denen das Schließen des ATPase-Dimers eine Öffnung der Transportpore nach außen bewirkt (Davidson et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel des Biotintransporters BioM₂NY aus *R. capsulatus* eine Bewegung der S-Einheit BioY nachgewiesen, die mit dem Kippmodell konform ist, und die Rolle von ATP im Zyklus der Substratbindung und -abgabe wurde beleuchtet. Der Biotintransporter bot ein geeignetes Untersuchungssystem für dieses Vorhaben, da er stabil aus Membranen isoliert werden kann. Zudem existierte aus vergangenen Arbeiten bereits eine cysteinfreie Variante des Transporters (Neubauer et al., 2011), die die Grundlage für experimentelle Ansätze bildete, in denen das gezielte Einbringen von Cysteinresten erforderlich war. Da im isolierten wildtypischen BioM₂NY-Komplex durch massenspektrometrische Analyse kein Substrat nachweisbar war, konnte von einem Zustand ähnlich dem der kristallisierten ECF-Transporter ausgegangen werden, in denen die S-Einheit substratfrei vorliegt (Swier et al., 2016; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014; Zhang, 2013). Chemische Quervernetzung einzelner künstlich eingefügter Cystein-Seitenketten in der TMH1 von BioY und CH2 von BioN belegte die räumliche Nähe dieser Regionen und untermauerte

die gekippte Topologie von BioY (Abb. 22). Um die Dynamik des Komplexes infolge der ATP-Bindung in einem der natürlichen Umgebung nahekommenden System beleuchten zu können, wurde der isolierte Transporter in Nanodiscs rekonstituiert. Nanodiscs sind kleine Scheibchen aus einer Phospholipid-Doppelschicht im Nanometer-Maßstab, die natürlichen Membranen ähneln und Membranproteine enthalten können (Borch und Hamann, 2009). Sogenannte Gürtelproteine, die Derivate des humanen Lipoproteins Apo-A1 sind, halten die Lipid-Protein-Komplexe zusammen und bringen diese aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaft gleichzeitig in Lösung. Da Nanodiscs erfolgreich zur Untersuchung struktureller Änderungen in kanonischen ABC-Transportern angewandt worden waren (Alvarez et al., 2010; Bao und Duong, 2013; Heuveling et al., 2014; Wuttge et al., 2016) und sich andererseits die Rekonstitution von BioM₂NY in Liposomen in der Vergangenheit als uneffektiv erwiesen hatte (Alfandega, 2008), war der Nanodisc-Ansatz vielversprechend. Obwohl die nach *LbEcfA1A2T* und *L/BioY* modellierte Struktur von BioM₂NY auf eine 2:1:1-Stöchiometrie (BioM:BioN:BioY) hinweist (Abb. 12), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass im natürlichen Transporter-Komplex Oligomere des ganzen Transporters oder seiner Komponenten existieren. Verschiedene experimentelle Daten hatten Hinweise auf Oligomere von *RcBioY* (Finkenwirth et al., 2010; Hebbeln et al., 2007; Kirsch et al., 2012) und *RcBioN* (Kirsch, 2015; Neubauer et al., 2011) geliefert, und es wurde daher zunächst geklärt, ob der Durchmesser der Nanodiscs Einfluss auf die stöchiometrische Zusammensetzung der eingebauten Komplexe hatte. Der Durchmesser wird im Wesentlichen durch die Länge des Gürtelproteins bestimmt. Durch Hinzufügen amphipathischer Helices zum ursprünglichen Gürtelprotein MSP1 und partielle Trunkierung waren unterschiedliche MSPs konstruiert worden, die in Nanodiscs von 10 bis 17 nm Durchmesser resultierten (Grinkova et al., 2010). Die Variation des Gürtelproteins (MSP1, etwa 10 nm, MSP1E3D1, etwa 12 nm und MSP2, etwa 17 nm) sowie des Lipidanteils hatten einen leichten, aber keinen signifikanten Effekt auf die Zusammensetzung der Nanodiscs, und da die Rekonstitutionseffizienz mit MSP1E3D1 am höchsten war, wurde mit diesem Gürtelprotein weiter gearbeitet (Abb. 36 im Anhang). Die Pixelanalyse solubilisierter und per SDS-PAGE aufgetrennter Nanodiscs deutete auf ein stöchiometrisches Verhältnis von 2 MSP zu 2 BioM hin (Abb. 13A). Da BioM₂NY ohne Berücksichtigung höherer Oligomerformen des Komplexes zwei BioM-Einheiten enthält (vgl. Modell in Abb. 12), wurde davon ein Einbauverhältnis von einem BioM₂NY-Komplex pro Nanodisc abgeleitet. Aufgrund der Ausdehnung von etwa 7 nm, die BioM₂NY im Strukturmodell einnimmt, erschien dieses Verhältnis realistisch.

In Nanodiscs rekonstituierte Transporter-Komplexe hatten gegenüber detergenzsolubilisierten Proteinen eine 1,5-fach (Wildtyp) bis 2,5-fach (cysteinfreie Variante) höhere ATPase-Aktivität und waren über Tage stabil, was die Vorliebe für eine näherungsweise natürliche Membrenumgebung unterstreicht. Sowohl in Detergenzlösung als auch in Nanodiscs wies der Transporter eine hohe ATPase-Aktivität auf, die durch Zugabe von Biotin nicht stimulierbar war. Dies steht im Gegensatz zu kanonischen ABC-Importern wie dem Maltosetransporter MalFGK₂-E aus *E. coli* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, bei dem die ATP-Hydrolyse erst durch Anwesenheit von beladenem Substratbindprotein (SBP) aktiviert wird, um einen vom Transport abgekoppelten ATP-Verbrauch zu minimieren (Böhm et al., 2013; Eitingen et al., 2011; Orelle et al., 2008). Dabei wird durch Interaktion des SBP mit den extrazellulären Regionen der TMDs ein Signal in Form von Strukturänderungen an die intrazelluläre Seite der TMDs übertragen, die ein komplettes Schließen des ATPase-Dimers um ATP zur Folge hat und damit die Hydrolyse ermöglicht (Chen, 2013; Oldham und Chen, 2011). Bei BioM₂NY hatte die Zugabe von Biotin dagegen eher eine leichte Hemmung der hohen Grundaktivität zur Folge (Abb. 13B), die auf eine entkoppelte ATP-Hydrolyse bei Abwesenheit von Substrat hinweist. Erst mit Substrat könnte eine Kopplung der ATP-Hydrolyse an die globalen Konformationsänderungen des Komplexes erfolgen, die mutmaßlich mit einer Translokation einhergehen. Da transportassoziierte Konformationsänderungen mit der Verrichtung von Arbeit verbunden sind, könnte dies zur Senkung der Hydrolyserate führen. Indizien für einen derartigen Substrateffekt ergeben sich auch aus der deutlich verstärkten Ausprägung ATP-getriebener Konformationsänderungen von BioY unter Anwesenheit von Biotin, die später in diesem Abschnitt diskutiert werden.

Durch eine partiell entkoppelte Hydrolyse könnte auch die geringe Hemmbarkeit des Transporters durch Orthovanadat erklärbar sein, welches bei einigen ABC-Transportern den posthydrolytischen Zustand fixiert und zur fast vollständigen Blockierung der ATP-Hydrolyse-Aktivität führt (Chen et al., 2001; Oldham und Chen, 2011; Urbatsch et al., 1995). In kanonischen ABC-Transportern wird das β -Phosphat von ATP und ADP vom Walker A-Motiv der einen und das γ -Phosphat von ATP durch das LSGGQ-/Signaturmotiv der anderen Untereinheit koordiniert (Davidson et al., 2008). Da die funktional relevanten Motive kanonischer ATPasen in ECF-ATPasen konserviert sind (Chai et al., 2013; Karpowich und Wang, 2013; Xu et al., 2013) und in der Kristallstruktur des AMP-PNP-gebundenen TmEcfA1A2-Dimers (Karpowich et al., 2015) dieselben Motive an der Nukleotidbindung beteiligt sind, wird ein konservierter Mechanismus bei beiden Subfamilien angenommen. Nach

einem Hydrolysezyklus und der Dissoziation von anorganischem Phosphat (P_i) bindet Orthovanadat in sensitiven ABC-ATPasen an dessen Stelle und bildet mit ADP ein stabiles $ADP \cdot V_i$ -Analogon des natürlichen und instabilen Hydrolyse-Intermediates $ADP \cdot P_i$, wodurch das ATPase-Dimer im ADP-gebundenen Zustand verbleibt (Sharma und Davidson, 2000). Eine geringe Hemmbarkeit durch Orthovanadat wurde allerdings auch für die isolierte ATPase (MalK) des Maltosetransporters aus *E. coli* beschrieben (Morbach et al., 1993). Es wird daher vermutet, dass die Vanadathemmung nur in einem funktionellen ATPase-Dimer effektiv ist, da dieses über die relativ langsame konformationelle Kopplung mit dem Transporter-Komplex stabilisiert wird und eine Bindung des Vanadatmoleküls erlaubt, bevor ADP dissoziiert (Sharma und Davidson, 2000). Die geringe Hemmbarkeit des Biotintransporters von nur etwa 50 % könnte deshalb in einer instabilen Dimerinteraktion oder zum Teil monomerischen Aktivität von BioM begründet liegen. Letztere wurde in der Vergangenheit mit isoliertem BioM im Rahmen einer Bachelorarbeit beobachtet (Quenkert, 2013). Zwar wurde auch für andere ECF-Transporter eine hohe Grundaktivität beschrieben (Karpowich et al., 2015; Swier et al., 2016; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014), ob dies eine Eigenschaft aller ECF-Transporter darstellt und auch *in vivo* auftritt, ist jedoch unklar. Anhand des bakteriellen Vitamin B₁₂-Transporters BtuC₂D₂ wurde allerdings unlängst demonstriert, dass eine vom Transport entkoppelte ATP-Hydrolyse physiologisch sinnvoll sein kann (Livnat-Levanon et al., 2016). Transporter-Komplexe, die unabhängig von einer Substrattranslokation ATP hydrolysierten, waren deutlich länger stabil und funktionell als Komplexe in Ruhe.

Über chemische Quervernetzung und ESR-spektroskopische Abstandsanalysen zwischen einzelnen Cysteinresten in beiden BioM-Untereinheiten konnte ein ATP-abhängiges Schließen und Öffnen des ATPase-Dimers nachgewiesen werden. BioM besitzt hinter dem Q-Loop eine kurze Sequenz (xPD/ExQφ), die nur in ECF-ATPasen vorkommt und aufgrund eines hochkonservierten Glutaminrestes als Q-Helix bezeichnet wird (Karpowich und Wang, 2013). Die Lage der Q-Helix im Interaktionsbereich der ATPase-Untereinheiten (Abb. 14B) und die in früheren Arbeiten beobachtete intrinsische Dimerisierung von BioM in der BioM_[D86C]₂NY-Variante, die einen Cysteinrest in der Q-Helix trägt (Neubauer et al., 2011), hatten eine Eignung dieser Region für Abstandsanalysen innerhalb des BioM-Dimers nahegelegt. Über Cysteinreste an den Positionen 86/86' oder 88/88' in beiden Untereinheiten konnte das BioM-Dimer mit den kurzen bifunktionellen Quervernetzern EBS (5 Å) und HBS (10 Å) im Transporter-Komplex verknüpft werden (Abb. 14A). Das verstärkte Auftreten von Vernetzungsprodukten nach ATP-Bindung wies auf eine Verkürzung des Abstands zwischen den Q-Helices hin. Diese

Schließbewegung wurde mithilfe gepulster ESR-Spektroskopie (*Double electron-electron resonance spectroscopy* - DEER) nach Spinmarkierung der Position 87/87' in BioM mit dem Nitroxid-Label MTSSL bestätigt (Abb. 15). Spin-Spin-Interaktionen lieferten drei distinkte Abstände für den Apo-Zustand (ohne Nukleotid, 34 Å), den ATP-gebundenen (27 Å) und den MgADP-gebundenen Zustand (posthydrolytisch, 39 Å). Da der Abstand der C_β-Atome zwischen den Positionen 87/87' der ATPasen im BioM₂NY-Modell etwa 13 Å beträgt und die Seitenketten vermutlich voneinander weg zeigen, sind die ermittelten Distanzen unter Berücksichtigung einer mittleren Länge des Nitroxid-Labels (Abstand zwischen C_β-Atom und NO-Gruppe) von 4-8 Å (Altenbach et al., 1989; Klose et al., 2012) mit dem Modell gut vereinbar. Leichte Differenzen können daher rühren, dass BioM₂N nach der Struktur des ECF-Moduls *LbEcfA1A2T* modelliert wurde, dessen ATPasen über eine C-terminale Domäne miteinander interagieren (Xu et al., 2013). Da diese Domäne bei BioM fehlt, ist eine leichte Abweichung der tatsächlichen Position vom Modell vorstellbar. Erstaunlicherweise nahmen die Positionen 87/87' im posthydrolytischen Zustand des BioM-Dimers, dessen Konformation durch die ADP-Bindung bestimmt wird, den größten Abstand ein. Die breite Abstandsverteilung im Apo-Zustand ließ eine hohe Flexibilität des BioM-Dimers vermuten, die durch Bindung von Nukleotiden stark eingeschränkt wurde und zu deutlich schmalere Abstandsverteilungen führte.

Distinkte Abstände in verschiedenen Katalysestadien wurden auch bei den ATPasen des Maltosetransporters (MalFGK₂) (Grote et al., 2008; Oldham und Chen, 2011) und des Histidintransporters (HisQMP₂) (Sippach et al., 2014) aus *E. coli* beobachtet. ESR-basierte Abstandsmessungen zwischen den Positionen 88/88' in den Q-Loops beider MalK-Untereinheiten hatten Abstände von 28 Å im Apo-Zustand, 18,5 Å nach ATP-Bindung und eine breite Verteilung mit Maxima bei 19,5 Å und 30 Å nach ATP-Hydrolyse geliefert. Obwohl der zusätzliche große Abstand von etwa 30 Å auch als Hinweis auf eine weite Öffnung des Dimers gesehen werden kann, wurde für das posthydrolytische Stadium ein halb-geöffneter Zustand vorgeschlagen (Grote et al., 2008). Zu diesem Schluss waren auch andere Untersuchungen der MalK-Dynamik gekommen (Lu et al., 2005; Orelle et al., 2008). Zwischen den Positionen 86/86' in beiden BioM-Untereinheiten waren ESR-basierte Abstandsmessungen nicht möglich, da dort bereits im Apo-Zustand Orbital-Überlappungen der Spinlabel auftraten, die auf einen sehr kurzen Abstand hindeuteten und mit der Nähe und Orientierung der Q-Helices im BioM₂NY-Modell übereinstimmen. Die Position 88/88' konnte nur sehr ineffizient spinmarkiert werden und war damit für die ESR-Spektroskopie nicht geeignet. Dies lässt vermuten, dass

diese Region durch eine dichte Packung gekennzeichnet ist, in der ein Einfluss der veränderten Dimerkonformation nach ATP-Bindung auf die Orientierung des Spinlabels möglich ist. Solche sterischen Wechselwirkungen könnten eine gewisse Verzerrung der zwischen den Positionen 87/87' ermittelten Abstände zur Folge haben.

Der Vergleich verfügbarer Kristallstrukturen von ECF-ATPase-Dimeren deutet allerdings darauf hin, dass die Relationen der Abstände des Apo-Zustands, des ATP-gebundenen und des MgADP-gebundenen Zustand bei anderen ECF-ATPasen vergleichbar sein könnten. Das ECF-ATPase-Dimer aus *T. maritima* wurde mit MgAMP-PNP (pdb-Code 4ZIR) (Karpowich et al., 2015) und MgADP (pdb-Code 4HLU) (Karpowich und Wang, 2013) kristallisiert; die Abstände der entsprechenden C β -Atome in den Q-Helices (Asp-89 und Ser-83) betragen dort 11,6 bzw. 17,6 Å. Die Struktur des ATPase-Dimers im Apo-Zustand ist nicht bekannt, da dieses vermutlich instabil ist. In den bekannten Holotransporter-Strukturen von *LbEcfA1A2T-FolT* (pdb-Code 4HUQ), -PdxU (pdb-Code 4HZU), -PanT (pdb-Code 4RFS) und *LdEcfA1A2T-FolT* (pdb-Code 5JSZ), die jeweils den Apo-Zustand repräsentieren, sind die Q-Helices jedoch an den entsprechenden C β -Atomen (Asn-92 und Asn-95 bei *LbEcfA1A2* sowie Ala-96 und Asn-95 bei *LdEcfA1A2*) mit 13 Å nur unwesentlich weiter voneinander entfernt, als im geschlossenen (MgAMP-PNP-gebundenen) *TmEcfA1A2*-Dimer. Beim ECF-Transporter *LdEcfA1A2T-FolT* aus *L. delbrueckii* konnte mit MgAMP-PNP keine geschlossene Konformation erreicht werden (Swier et al., 2016). Obwohl die Strukturen der Holotransporter und des isolierten Dimers nicht direkt miteinander vergleichbar sind, deuten die Relationen der verschiedenen Abstände darauf hin, dass ECF-ATPasen im posthydrolytischen Zustand generell weiter geöffnet sein könnten als kanonische ABC-ATPasen.

Überraschenderweise hatte die Zugabe von Biotin zum ATP-gebundenen Komplex eine Vergrößerung des Abstands zwischen den Positionen 87/87' zur Folge, der mit etwa 34 Å dem des Apo-Zustands entsprach (Abb. 38B im Anhang). Obwohl ein Auseinanderdrücken der ATPasen mit dem hemmenden Effekt von Biotin auf die Aktivität im Einklang stehen könnte, deutete die Verfolgung der Konformationsänderung von BioY, die weiter unten diskutiert wird, eher auf einen entgegengesetzten Effekt hin, der die Bewegung des Dimers unterstützt. Eine leicht verstärkte Quervernetzung der ATPasen mit EBS an den Positionen 88/88' ließ ebenfalls eher eine Unterstützung der Schließbewegung durch Biotin vermuten (Abb. 38A im Anhang). Da die Seitenketten an den untersuchten drei Positionen in der Q-Helix allerdings in völlig unterschiedliche Richtungen orientiert sind, könnte eine asymmetrische Dynamik des BioM-

Dimers gegensätzliche Abstandseffekte erklären. Zur tiefergehenden Charakterisierung des Schließmechanismus, der beim Maltosetransporter beispielsweise mit einer leichten Drehbewegung der helikalen Subdomäne von MalK einhergeht (Oldham und Chen, 2011; Oldham et al., 2007), müssten weitere Abstandsanalysen zwischen anderen Positionen im BioM-Dimer durchgeführt werden. Dabei wäre auch interessant, ob eine positive Kooperativität beider katalytischer Zentren, wie sie für unterschiedliche ABC-Systeme beschrieben wurde (Davidson und Sharma, 1997; Hopfner et al., 2000; Urbatsch et al., 1995), beobachtet werden kann.

Die hier gezeigte Dimerbewegung stellt den ersten Nachweis eines ATP-abhängigen Schließens und Öffnens der ATPasen in einem ECF-Holotransporter dar, in dessen Folge transportassoziierte Konformationsänderungen im Komplex bewirkt werden. Die Schließbewegung des BioM-Dimers muss – über BioN vermittelt – eine für die Substratbindung hinreichende Konformationsänderung von BioY bewirken. ECF-ATPasen stehen über eine saure Tasche in der helikalen Domäne mit jeweils einem konservierten Argininrest am C-Terminus der Kopplungshelices CH2 und CH3 der T-Einheit in Verbindung (Neubauer et al., 2009; Neubauer et al., 2011; Zhang, 2013). Die Kopplungshelices selbst liegen in einer hydrophoben Rinne zwischen der RecA-ähnlichen und der helikalen Domäne der ATPasen (Neubauer et al., 2011; Zhang, 2013). Den Q-Helices des ATPase-Dimers könnte eine besondere Rolle bei der mechanischen Kopplung des Öffnens und Schließens an die Konformationsänderungen der T-Einheit zukommen, die schließlich zur Kippbewegung der S-Einheit führt. Karpowich und Wang hatten nach Strukturbestimmung des ECF-ATPase-Dimers aus *T. maritima* geschlossen, dass eine Salzbrücke zwischen dem konservierten sauren Rest in der Q-Helix (zwei Positionen vor dem namensgebenden Glutaminrest, Glu-88) mit einem positiven Rest (Arg-145) hinter dem Signaturmotiv eine „molekulare Bremse“ darstellen könnte (Karpowich und Wang, 2013). Diese Salzbrücke würde durch Substratbindung an die S-Einheit auf nicht charakterisierte Weise gelöst werden, sodass die helikale Domäne mit dem Signaturmotiv in analoger Weise zum Mechanismus von MalK (Oldham und Chen, 2011) in Richtung der katalytischen Domäne der anderen ATPase schwingen und ATP stabil binden könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten lassen sich mit einer solchen „Bremse“ jedoch nicht vereinen und deuten vielmehr darauf hin, dass die Q-Helix eine generelle Funktion in der Stabilisierung des ATPase-Dimers haben könnte. Zwar zeigt die Transporter-Variante

BioM_{[D86C]2}NY, in der der mutmaßlich an der Salzbrücke beteiligte Aspartatrest durch ein Cystein ersetzt wurde, sehr hohe ATPase-Aktivität (Neubauer et al., 2011)(diese Arbeit, Abb. 28), Austausch gegen Lysin oder Asparagin an dieser Position sowie ein Austausch des Arg-141, dem postulierten Interaktionspartner des Asp-86, gegen Glutamat hatten jedoch keine Aktivitätserhöhung zur Folge, obwohl die veränderten Seitenketten die Ausbildung der Salzbrücke innerhalb von BioM verhindern würden. Möglicherweise lag die Ursache für die erhöhte Aktivität in der spontanen Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den BioM-Monomeren begründet, die an dieser Position beobachtet worden war (Neubauer et al., 2011) und die räumliche Nachbarschaft dieser Positionen im Komplex unterstreicht. Dies könnte auch die erhöhte Aktivität der Q88C-Variante erklären (Abb. 28). Da die Zugabe von DTT zur Reduktion potentieller Disulfidbrücken jedoch keinen messbaren Einfluss auf die ATPase-Aktivität hatte, ist die Ursache für diese Aktivitätserhöhung weiter unklar.

Überraschenderweise wurde durch einige Aminosäureveränderungen in der Q-Helix die Wirkung von Biotin auf die ATPase-Aktivität völlig umgekehrt und bewirkte nicht, wie beim Wildtyp, eine Hemmung, sondern eine Stimulation der Aktivität (Abb. 28). Eine Erklärung dafür könnte in einer geschwächten Dimerinteraktion in BioM₂ liegen, die auf dem Austausch der konservierten Reste Asp-86, His-87 und Gln-88 in der Q-Helix beruht. Die Bindung von Biotin an BioY könnte das Schließen des BioM-Dimers begünstigen und so den Effekt kompensieren. Ein ausgeprägtes Netz von Wasserstoffbrücken unter Beteiligung der Q-Helices im geschlossenen ECF-ATPase-Dimer von *T. maritima* unterstützt die Hypothese, dass die Q-Helices beider Untereinheiten miteinander interagieren (Karpowich et al., 2015; Karpowich und Wang, 2013). Die Strukturen der ECF-Holotransporter zeigen außerdem, dass die Q-Helix und der ihr folgende hydrophobe Abschnitt einen Bereich in der helikalen Domäne bilden, der stark mit den Kopplungshelices CH2 bzw. CH3 in Verbindung steht (Swier et al., 2016; Wang et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014). Dass diese Regionen in BioM₂NY ausgeprägt miteinander interagieren, war mithilfe von umfangreichen Quervernetzungen bereits vor der Lösung von Transporterstrukturen gezeigt worden (Neubauer et al., 2011). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Q-Helices über ihre feste Interaktion im geschlossenen ATPase-Dimer (s. Abb. 32) einen Beitrag zur Übertragung der Konformationsänderung auf die Kopplungshelices der T-Komponente leisten und damit eine Rolle einnehmen, die mit dem Q-Loop kanonischer ABC-Importer vergleichbar ist (Oldham et al., 2007).

Ausgehend von der überkreuzten Topologie in den Kristallstrukturen ganzer ECF-Transporter war eine scherenartige Bewegung (Zhang, 2013) oder ein Aneinandervorbeigleiten der CH2 und CH3 (Karpowich et al., 2015) der T-Einheit als Folge der Schließbewegung der ATPasen vorgeschlagen worden. Die Art und Weise, wie diese Bewegung zu einer Aufrichtung der S-Einheit führen könnte, war bisher jedoch völlig unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufrichtung einer S-Einheit im Transporter-Komplex am Beispiel von BioM₂NY als Folge der ATP-Bindung erstmalig experimentell nachgewiesen. Der umgebungssensitive Fluoreszenzmarker Maleimidyl-8-anilinonaphtalin-1-sulfonat (MIANS), dessen Fluoreszenzemissionsmaximum durch die Polarität seiner Umgebung beeinflusst wird (Wan et al., 2009), wurde als Sonde an den extrazellulären Schleifenregionen 1 (Position 26) und 3 (Position 137) von BioY eingesetzt. In einer hydrophoben Umgebung ist das Fluoreszenzmaximum von MIANS in den kurzwelligen Bereich (hypsochrom) verschoben, in einer polarerer Umgebung in den längerwelligen Bereich. ATP-induzierte Verschiebungen des Fluoreszenzmaximums von BioY_[L26C-MIANS] und BioY_[K137C-MIANS] im BioM₂NY-Komplex waren konsistent mit einer Umlagerung der markierten Schleifenregionen aus dem hydrophoben Kern des Transporters in die extrazelluläre Region, die bei einer Aufrichtung aus der gekippten Topologie zu erwarten ist (Abb. 24).

Die Auswirkungen von Tryptophanresten anstelle der kleinen hydrophoben Aminosäuren Ala-12, Ala-13 und Val-16 in BioY hatten vermuten lassen, dass die kleinen hydrophoben Aminosäuren in der TMH1 mit der T-Komponente (BioN) in Verbindung stehen (Kiesler, 2013). Per Quervernetzung wurde als interagierender Bereich die hydrophobe Seite der amphipathischen CH2 von BioN identifiziert (vgl. Modell Abb. 12). Die Vernetzung von BioN (über Positionen 143 oder 147 in CH2) und BioY (mit Position 16 oder 17 in TMH1) mit abstandsspezifischen Vernetzern zeigte zwar geringfügige Veränderungen der Distanzen zwischen einzelnen Positionen nach ATP-Zugabe an. Die grundsätzlich unveränderte Vernetzbarkeit belegt aber, dass die Interaktion zwischen T- und S-Einheit in diesem Bereich auch nach der Aufrichtung von BioY erhalten bleibt und dynamisch ist (Abb. 22). Durch MIANS-Fluoreszenz wurde außerdem eine starke Zunahme der Hydrophobizität im Bereich der CH2 (BioM₂N_[V147C-MIANS]Y) beobachtet. Zusammengenommen deutet dies auf einen Mechanismus hin, in dem die CH2 durch Schließen des ATPase-Dimers tief in die Membran gedrückt wird und so BioY in eine aufrechte Position hebt (Abb. 32). Im Rahmen einer Masterarbeit wurde die Bewegung, die BioY dabei vollzieht, per längenspezifischer Quervernetzung zwischen BioN an Position 82, die im extrazellulären *Loop* 3 gelegen ist, und

BioY an den Positionen 26 (im *Loop* 1), 137 und 152 (beide im *Loop* 3) näher beleuchtet (Grunzel, 2015). Nach ATP-Bindung wurden Abstandsvergrößerungen zwischen diesen Positionen beobachtet, die durch eine Aufrichtung von BioY erklärt werden können. Da sich die MANS-Fluoreszenz an Position 152 zwischen solitärem BioY und BioM₂NY nicht unterschied (Abb. 23), liegt dieser Bereich vermutlich in gekippter und senkrechter Topologie in der Membran vergraben. Zusammen lassen die Quervernetzung und MANS-Fluoreszenz ein Anheben bei gleichzeitiger Rotation von BioY um dessen Längsachse vermuten, wodurch die Substratbindestelle nach außen verlagert werden würde (Abb. 32).

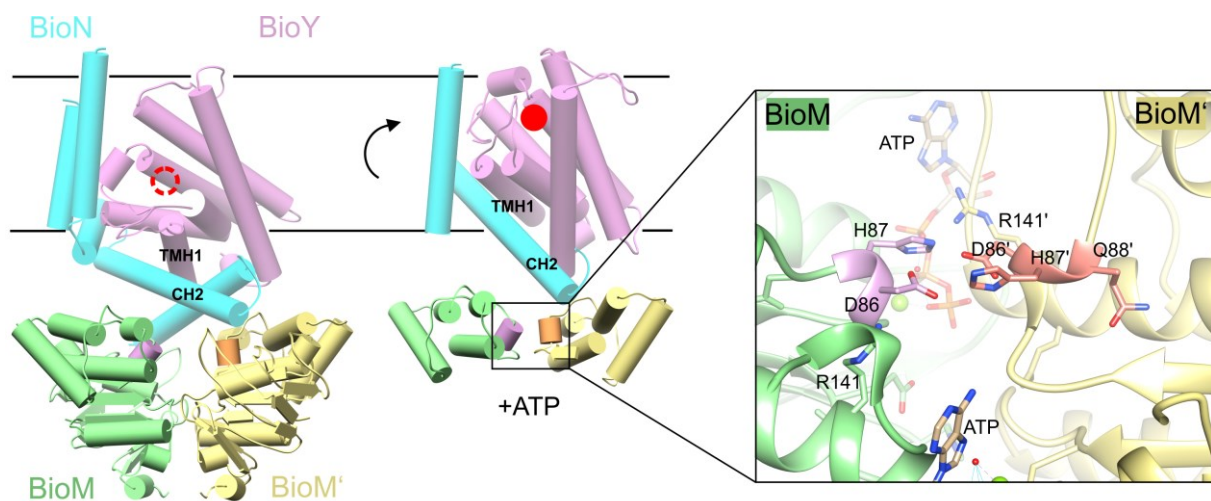


Abb. 32: ATP-induzierte Konformationsänderungen führen zur Biotinbindung in BioM₂NY. Die Schließbewegung des BioM-Dimers infolge der ATP-Bindung führt zu einer Konformationsänderung der Kopplungshelices (CHs) von BioN und darüber zu einer Aufrichtung von BioY im Komplex, die eine Substratbeladung ermöglicht. Die Interaktion der amphiphilen CH2 mit TMH1 von BioY bleibt während des Zyklus bestehen. Die Q-Helices (lila und hellbraun) liegen jeweils zwischen dem katalytischen Zentrum und dem Signaturmotiv und tragen über mutmaßliche Wasserstoffbrücken zu einer Stabilisierung des geschlossenen BioM-Dimers bei. Das Modell des ATP-gebundenen BioM-Dimers wurde nach dem AMP-PNP-gebundenen *TmEcfA1A2*-Dimer (pdb-Code 4ZIR) durch den SWISS MODEL-Server (Biasini et al., 2014) erstellt und mithilfe der Visualisierungssoftware UCSF CHIMERA (Pettersen et al., 2004) bearbeitet. Der Vergleich der C α -Atom-Koordinaten von BioM bzw. BioM' und *TmEcfA1* bzw. *TmEcfA2* lieferte RMSDs von 2,74 Å für 211 AS und 3,13 Å für 215 verglichene AS.

Versuche, die ATP-abhängige Bewegung von BioY mithilfe ESR-spektroskopischer Abstandsanalysen zwischen verschiedenen spinmarkierten Positionen in BioN und BioY tiefergehend zu charakterisieren, scheiterten bisher an multiplen Spin-Spin-Interaktionen, die eine Auflösung und Zuordnung distinkter Abstände verhinderten und erneute Hinweise auf homodimerisierte BioN- bzw. BioY-Formen nach Einbau der Transporter in Nanodiscs

lieferten. Per Gelfiltration wurden monodisperse Transporter-Komplexe isoliert, die mutmaßlich BioM₂NY-Monomere darstellten, jedoch nach dem Einbau in Nanodiscs keine merkliche Verringerung der multiplen Spin-Spin-Interaktionen bewirkten. Als eine mögliche Erklärung wurde eine Aggregation mehrerer Nanodiscs in Betracht gezogen, die zu Spin-Wechselwirkungen zwischen separaten Nanodisc-Transporter-Komplexen führen könnte. Eine Verdünnung der Nanodiscs zur Minimierung möglicher Aggregate erzielte jedoch keine Verbesserung, weshalb dieses sogenannte *Stacking* als Ursache unwahrscheinlich ist. Es ist weiterhin vorstellbar, dass während des Entzugs von Detergenzmolekülen beim Einbau in die Nanodiscs hydrophobe Wechselwirkungen auftreten, die eine Bildung von Oligomeren begünstigen. Daher sollen im weiteren Vorgehen Messungen mit Komplexen in Detergenzlösung erfolgen.

Dass die Topologieänderung von BioY, wie im Modell postuliert, eine Voraussetzung für die Substratbeladung des Transporters darstellt, wurde über den Nachweis der Bindung von radioaktiv markiertem Biotin an BioM₂NY in Nanodiscs gezeigt. In Gegenwart von ATP konnte signifikant mehr Biotin gebunden werden als in dessen Abwesenheit, und nach Hydrolyse von ATP waren nur Hintergrundmengen am Komplex verblieben (Abb. 25). Da nach 20-minütiger Inkubation der Ansätze mit MgATP bei 37 °C von einem vollständigen Umsatz des ATPs auszugehen war, verblieb der Komplex mutmaßlich im ADP-gebundenen, posthydrolytischen Zustand. Dies war konsistent mit einer ebenfalls geringen Biotinbindung nach direkter MgADP-Zugabe, die eine Konformation vergleichbar mit der des posthydrolytischen Stadiums bewirkt. Darauf hatten bereits die ESR-spektroskopischen Abstandsmessungen zwischen den Q-Helices der BioM-Monomere hingedeutet, die nach ATP-Hydrolyse und MgADP-Zugabe annähernd gleiche Abstände nachwiesen (Abb. 15). Da die Hydrolyse von ATP nachweislich zu einem Wiederöffnen des geschlossenen BioM-Dimers führt, ist anzunehmen, dass auch BioY nach der Biotinbindung wieder in seine Ausgangsposition zurückkehrt und deshalb die Substratabgabe mit dem Umkippen verbunden ist. Dies wurde durch einen Vergleich mit der inaktiven Transportervariante BioM_{[E161Q]2}NY untermauert, deren Fähigkeit zur Hydrolyse durch Austausch des katalytischen Carboxylats hinter dem Walker B-Motiv gegen ein Glutamin blockiert ist. Diese Variante hatte dementsprechend mit ATP und MgATP vergleichbare Mengen an Biotin gebunden, eine Abgabe war aufgrund mangelnder Hydrolyse nicht möglich (Abb. 25). Spannend wäre, ob trotz der mäßigen ATPase-Hemmbarkeit mit Orthovanadat ein differenzierbarer Abstand zwischen den ATPasen im MgADP•V_i-gebundenen Zustand besteht, der die geschlossene Übergangskonformation des Komplexes vor der Dissoziation von P_i

repräsentiert (Sharma und Davidson, 2000) und ob in diesem Zustand Biotin am Komplex gebunden ist. Für den Maltosetransporter aus *E. coli* und das P-Glykoprotein war vorgeschlagen worden, dass die freie Energie aus der P_i -Freisetzung mit der Substratabgabe verbunden ist (Chen et al., 2001; Orelle et al., 2008; Urbatsch et al., 1995). Eine Auflösung konformationeller Unterschiede zwischen den einzelnen Katalyse-Stadien ($MgATP / MgADP \cdot P_i / MgADP$) könnte daher relevante Informationen über die Kopplung von Substrattransport und ATP-Hydrolyse preisgeben.

Bemerkenswerterweise hatte die Bindung von Biotin einen verstärkenden Effekt auf die ATP-induzierte Aufrichtung von BioY. Dieser Effekt wurde mit MANS-Fluoreszenz beobachtet (Abb. 24) und auch im Rahmen der Quervernetzung der Schleifenregionen von BioN und BioY beschrieben (Grunzel, 2015). Dort hatte die Zugabe von Biotin zum ATP-beladenen Transporter die Quervernetzung zwischen den Positionen 82 in *Loop* 3 von BioN und 26 in *Loop* 1 oder 137 bzw. 152 (beide *Loop* 3) von BioY noch verstärkt. Verantwortlich für diesen Effekt könnte der *Loop* 1 in BioY sein, der die ersten beiden TMHs verbindet. In der Kristallstruktur des biotinbeladenen BioY aus *L. lactis* ist diese Schleife auf die Substratbindestelle geklappt und über Wasserstoffbrücken, die vom Peptidrückgrat ausgehen, an der Koordination des Ureidoringes von Biotin beteiligt (Berntsson et al., 2012). Eine vergleichbare Konformation nimmt diese Schleife auch in den anderen substratbeladenen S-Einheiten *LlThiT*, *SaRibU*, *LdFolT1*, *EfFolT* und *TtNikM2* ein (Erkens et al., 2011; Swier et al., 2016; Yu et al., 2014; Zhang et al., 2010; Zhao et al., 2015). Die Verfolgung der Strukturodynamik während der Thiaminbindung an *LlThiT* (Majsnerowska et al., 2013) sowie ein Strukturvergleich von substratfreien und -beladenen S-Einheiten für Folat (Swier et al., 2016; Zhao et al., 2015) hatten offengelegt, dass außer den Schleifen 1, 3 und 5 keine anderen Regionen merkliche Konformationsänderungen vollführen, die mit der Substratbindung einhergehen. In allen Strukturen ganzer ECF-Transporter (Swier et al., 2016; Wang et al., 2013; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014) ragt der *Loop* 1 von der Substratbindestelle weg. Es ist vorstellbar, dass der geöffnete *Loop* 1 bei Aufrichtung der S-Einheit mit TMH3 und TMH4 der T-Komponente kollidieren und dadurch zunächst ein vollständiges Aufrichten verhindern würde, welches erst durch Zuklappen des *Loop* 1 auf die Bindetasche infolge der Substratbindung ermöglicht würde. Da das Schließen der ATPasen die Aufrichtung der S-Einheit antreibt, ist eine Rückkopplung der Substratbindung auf das ATPase-Dimer und damit auf die ATPase-Aktivität, wie sie eingangs diskutiert wurde, vorstellbar. Um zu beurteilen, ob und wie diese Wirkung mit der leichten Hemmung der ATPase-Aktivität von BioM₂NY nach Biotinzugabe im

Zusammenhang stehen könnte, sind tiefergehende strukturdynamische Untersuchungen erforderlich.

Dass der aufgerichtete Zustand von BioY eine geschlossene Konformation (substratbeladen) und die gekippte Topologie die geöffnete Konformation (substratfrei) der Bindetasche bevorzugt, wird auch aus der Beobachtung deutlich, dass die alleinige Zugabe von Biotin eine Dissoziation der BioY-Einheit vom BioM₂NY-Komplex bewirkte (Abb. 26 und Abb. 27). Da während der Isolation des Transporters aus Membranen zugesetztes Biotin nicht gebunden wurde (vgl. Abschnitt 2.3), war zunächst davon ausgegangen worden, dass die Bindestelle im Komplex vergraben ist. Der Komplexzerfall zeigt jedoch, dass die Substratbindestelle in detergentsolubilisiertem BioM₂NY durchaus zugänglich ist, eine geschlossene Konformation mit einem auf die Bindetasche geklappten *Loop* 1, die wahrscheinlich mit der Biotinbindung einhergeht, aber nicht mit der gekippten Topologie von BioY vereinbar ist. Dass dieser Zerfall eine Folge der spezifischen Biotinbindung durch BioY ist, wurde dadurch bestätigt, dass der Transporter mit inaktivierter Bindestelle (BioM₂NY_[D164N]) erhalten blieb. Ob die *in vitro* beobachtete Dissoziation auch unter physiologischen Bedingungen eine Bedeutung hat, ist unklar. Als Hinweis, dass Biotin auch in einer Membranumgebung einen Komplexzerfall herbeiführen könnte, kann der Biotineffekt auf die MANS-Fluoreszenz des an den Positionen 137 (BioY) und 147 (BioN) markierten Transporters in Nanodiscs angesehen werden, der bereits auf eine Aufrichtung hindeutete (Abb. 24). Darüber hinaus konnten auch ohne ATP Spuren von Biotin durch den Transporter in Nanodiscs gebunden werden (etwa 1 pmol pro 10 pmol Protein) (Abb. 25), was mit einer Bindung durch BioY und Dissoziation vom Komplex erklärt werden könnte. Die Störung der Interaktion von BioY und BioM₂N durch Biotin zeigt in jedem Fall, dass die gekippte Topologie von BioY im Transporter-Komplex mit einer geschlossenen Substratbindestelle unvereinbar ist. Dies wird nicht zuletzt daran deutlich, dass diese Dissoziation der BioY-Einheit durch ATP verhindert wurde (Abb. 26 und Abb. 27). Dieser Effekt unterstützt die Rolle von ATP in der Substratbindung und demonstriert, dass nur in der aufgerichteten Topologie der S-Einheit eine Beladung möglich ist. Dies liefert einen Hinweis auf einen möglichen Mechanismus der Substratfreigabe, der auch von der Struktur des ECF-Transporters für Folat aus *L. delbrueckii* abgeleitet worden war (Swier et al., 2016). Während des Kippens aus der aufrechten Position könnte der auf die beladene Bindestelle geklappte *Loop* 1 mit den TMHs der T-Komponente sterisch kollidieren und deshalb aus seiner Position verdrängt werden. Dadurch würde die Substratbindestelle, an deren Ausbildung der *Loop* in

vielen S-Einheiten beteiligt ist (Zhang, 2013), zerstört und die Affinität für das Substrat drastisch reduziert werden, was dessen Freisetzung ins Zytosol zur Folge hätte.

3.5 Mechanistische Unterschiede zwischen ECF-Transportern der Subklassen I und II

Dass ATP eine Schlüsselrolle bei der Substratbeladung spielt, wurde unlängst auch am Beispiel eines ECF-Transporters der Subklasse II aus *L. monocytogenes* demonstriert (Karpowich et al., 2015). Bemerkenswerterweise wurden dabei gravierende mechanistische Unterschiede zum Biotintransporter BioM₂NY offenbar, die generell zwischen ECF-Transportern der Subklassen I und II bestehen könnten. Die Autoren hatten gezeigt, dass die Bindung von ATP die Affinität des *LmEcfA1A2T*-Komplexes für substratfreies RibU drastisch herabsetzt, so dass dieses buchstäblich ausgeworfen wird, und vorgeschlagen, dass nur substratbeladene S-Einheiten stabil an den ATP-gebundenen EcfA1A2T-Komplex binden können. Dieser „*release and catch*“-Mechanismus könnte eine mögliche molekulare Erklärung für den bei ECF-Transportern der Subklasse II beobachteten substratabhängigen Wettbewerb unterschiedlicher S-Einheiten um ein EcfA1A2T-Modul liefern (Henderson et al., 1979; Majsnerowska et al., 2015), da er nicht nur den Austausch der S-Einheiten, sondern gleichzeitig die wechselseitige Transporthemmung in Abhängigkeit von der Konzentration der jeweiligen Vitamine erklärt. In *L. casei* wurden ECF-Transporter ursprünglich beschrieben, weit bevor Details ihrer molekularen Organisation bekannt waren (Henderson et al., 1979). Damals war eine zunehmende Hemmung der Aufnahme eines der drei Vitamine Folat, Thiamin bzw. Biotin beobachtet worden, wenn eines der beiden anderen in steigenden Konzentrationen hinzugefügt wurde.

Während *ecfA1A2T*-Gene meist konstitutiv exprimiert werden, unterliegt die Produktion von S-Einheiten in den meisten Fällen einer Regulation durch Transkriptionsfaktoren, *Riboswitches*, TRAP (*Tryptophan Attenuator Protein*) oder T-Box-Elemente (Eitinger et al., 2011; Rodionov et al., 2009). *Riboswitches* sind dreidimensional gefaltete Bereiche im 5'-Bereich von mRNAs, deren Struktur durch ein Substrat stabilisiert wird, wodurch es zur Blockade der Transkription oder Translation kommt (Serganov und Nudler, 2013). T-Box-Elemente und TRAP regulieren die Expression von Genen, die mit der Aufnahme oder Biosynthese von Aminosäuren (bei TRAP speziell von Tryptophan) im Zusammenhang stehen. Dabei wird ebenfalls die Struktur der naszierenden mRNA beeinflusst, indem spezielle

ungeladene tRNAs (Green et al., 2010) oder Tryptophan-komplexiertes TRAP an ein Sequenzmotiv der mRNA binden (Yakhnin et al., 2004). Da die Produktion von S-Einheiten also hochgefahren wird, wenn die Konzentration der jeweiligen Substrate in der Zelle niedrig ist, entsteht bei gleichbleibender Produktion von EcfA1A2T-Komponenten vermutlich ein Überschuss an freien S-Einheiten, die verfügbare Substrate binden können und mit anderen S-Einheiten um die limitierenden EcfA1A2T-Module in Konkurrenz stehen. Dass eine wechselseitige Transporthemmung aber nicht nur eine Folge der Expressionskontrolle der Gene für S-Einheiten ist, wurde daran deutlich, dass auch nach rekombinanter Produktion von EcfA1A2T und zusätzlich der S-Einheiten für Thiamin und Niacin aus *L. lactis* in *E. coli* der Transport eines Substrates durch das jeweils andere Substrat gehemmt wurde (Majsnerowska et al., 2015). Dies zeigt, dass beladene S-Einheiten gegenüber substratfreien S-Einheiten bei der Konkurrenz um das EcfA1A2T-Modul im Vorteil sind.

Bei ECF-Transportern der Subklasse I sind die Komponenten allerdings aufgrund von Koexpression und Koregulation aneinander gekoppelt (Rodionov et al., 2009), weshalb die Dissoziation der S-Einheit mechanistisch keinen Vorteil bietet. Da in einigen Organismen ECF-Transporter beider Subklassen existieren, wäre ein solcher Mechanismus möglicherweise sogar hinderlich für die produktive Assoziation der Transporter-Komponenten. Daher könnten bei ECF-Transportern der Subklasse I strukturelle Anpassungen zum Erhalt einer stabileren Interaktion zwischen der S- und T-Einheit geführt haben. Unter dem Aspekt der Oligomerisierung von S-Einheiten (vgl. Abschnitt 3.3) wurde bereits diskutiert, dass das hydrophobe Motiv („AxxxA“) in der TMH1 von S-Einheiten vermutlich keine spezifische Rolle im Tauschmechanismus der Subklasse II-Transporter spielt. Am Beispiel der ECF-Transporter aus *L. brevis* war vielmehr eine weitläufige hydrophobe Kontaktfläche vorgeschlagen worden, die von TMH1, TMH2 und TMH6 und den *Loops* 1 und 3 der S-Einheiten gebildet wird und eine Interaktion unterschiedlicher S-Einheiten mit CH2 und CH3 sowie TMH3 und TMH4 der T-Komponente ermöglichen könnte (Zhang et al., 2014). Diese Interaktionsfläche könnte in Subklasse II-Transportern durch die ATP-getriebenen Konformationsänderung der Kopplungshelices gestört werden und so zu einer Dissoziation der S-Einheit führen (Karpowich et al., 2015). Der Austausch von substratfreien gegen substratbeladene S-Einheiten, der bei *LmEcfA1A2T*-RibU beobachtet worden war, wurde über eine höhere Affinität des ATP-gebundenen EcfA1A2T-Komplex für substratbeladene S-Einheiten erklärt. Als Ursache dafür wurde die geschlossene Konformation der *Loops* 1 und 3 vorgeschlagen, die mit der Substratbindung mutmaßlich einhergeht (Karpowich et al., 2015).

Eine stabile Interaktion substratbeladener S-Einheiten mit dem ATP-gebundenen EcfA1A2T-Komplex wurde allerdings mit dem Argument, dass gerade die auf die Bindetasche geklappten *Loops* 1 und 3 im Holotransporter mit den TMH1, TMH3 und TMH4 der T-Komponente kollidieren würden, generell infrage gestellt (Swier et al., 2016). Diesem alternativen Modell zufolge würde nach dem ATP-induzierten Auswurf der substratfreien S-Einheit die ATP-Hydrolyse erfolgen und den Komplex in den Ruhezustand zurück versetzen. Substratbeladene S-Einheiten, so der Vorschlag, würden dann selbst in der Membran kippen, was ihnen die kompakte und nach außen hin hydrophobere Konformation durch auf die Bindetasche geklappte *Loops* 1 und 3 ermöglichen würde, und an den ATP-freien Komplex andocken. Die Interaktion mit der hydrophoben Kontaktfläche der T-Einheit würde dann nach dem oben diskutierten Mechanismus durch sterische Verdrängung der *Loops* zur Freisetzung des Substrates führen. Dieses Modell zieht eine intrinsische Fähigkeit von S-Einheiten, in der Membran zu kippen, in Betracht und wird u.a. mit der Transportfunktion solitärer BioY-Proteine begründet, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurde. Es ist auch vereinbar mit der intrinsisch hohen ATPase-Aktivität, die für ECF-Transporter beider Subklassen beschrieben worden ist (Hebbeln et al., 2007; Karpowich et al., 2015; Swier et al., 2016; Xu et al., 2013; Zhang et al., 2014), und greift die Frage auf, welcher Mechanismus das geschlossene ATPase-Dimer an der Hydrolyse hindern sollte, bevor es zur Bindung einer neuen, beladenen S-Einheit käme. Das Modell berücksichtigt jedoch nicht, dass BioM₂NY nach ATP-Bindung als Holotransporter erhalten bleibt. Zwar konnte in dem Experiment, welches die ATP-abhängige Stimulation der Biotinbindung an den Transporter in Nanodiscs zeigt, prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, dass BioY sich nach ATP-Zugabe von BioM₂N löst und separat in der Nanodisc sitzend Substrat bindet (Abb. 25). Dass BioY infolge der ATP-Bindung fester Bestandteil von BioM₂NY-Komplexen blieb, wird jedoch durch drei Beobachtungen gestützt: (i) Die TMH1 von BioY kann mit der CH2 von BioN in Detergenzlösung sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von ATP vernetzt werden. Zwar zeigen längenspezifische *Crosslinker* Abstandsänderungen nach ATP-Zugabe an, diese spiegeln aber eine veränderte Positionierung der beiden Regionen relativ zueinander wider, und nicht die räumliche Trennung durch Komplexzerfall (Abb. 22). (ii) Auch durch Gelfiltration des detergenzsolubilisierten BioM₂NY-Komplexes wurde kein Auswurf von BioY nach ATP-Zugabe beobachtet, der Komplex eluierte nach wie vor als ein Peak von der Säule (Abb. 26). (iii) Über BioM an eine Matrix immobilisierte BioM₂NY-Komplexe konnten in Gegenwart von ATP mit Biotin beladen werden, während sie in Abwesenheit von ATP durch Biotin zerstört wurden (Abb. 27). Vergleichbar stabil mit ATP war BioM₂NY aus *A. tumefaciens* (s. Anhang Abb. 37).

Es zeichnet sich somit ab, dass ECF-Transporter der Subklassen I und II Variationen eines in seinem Grundsatz einheitlichen Kippmechanismus nutzen könnten, die entweder durch den Erhalt des Holotransporters oder einen Abwurf der S-Einheit gekennzeichnet sind (Abb. 33). Nach welchem Mechanismus die Nickel- und Kobalttransporter funktionieren, ist bisher unklar. Da der isolierbare Komplex des Kobalttransporters aus *R. capsulatus* nur aus S-, T- und A-Komponenten (CbiMQO) (Siche et al., 2010) bestand, ist anzunehmen, dass dieser wie andere ECF-Transporter den Ruhezustand mit mutmaßlich gekipptem CbiM (S) repräsentierte. Eine stabile Interaktion mit der für den Transport unentbehrlichen Komponente CbiN war in diesem Zustand nicht möglich und die Fusion von CbiN mit CbiM hatte sogar eine Destabilisierung der Interaktion von CbiM (S) und CbiQ (T) zur Folge. Dies könnte bedeuten, dass CbiN entweder im Komplex nur mit aufgerichtetem, nicht aber mit gekipptem CbiM wechselwirken kann oder eine stabile Interaktion nur mit CbiM möglich ist, wenn dieses vom CbiQO-Komplex gelöst ist. Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden in Abb. 33 gezeigten Mechanismen näher zu charakterisieren, sind viele weitere Daten zur Struktur und Dynamik, insbesondere von Subklasse I-Transportern, dringend erforderlich.

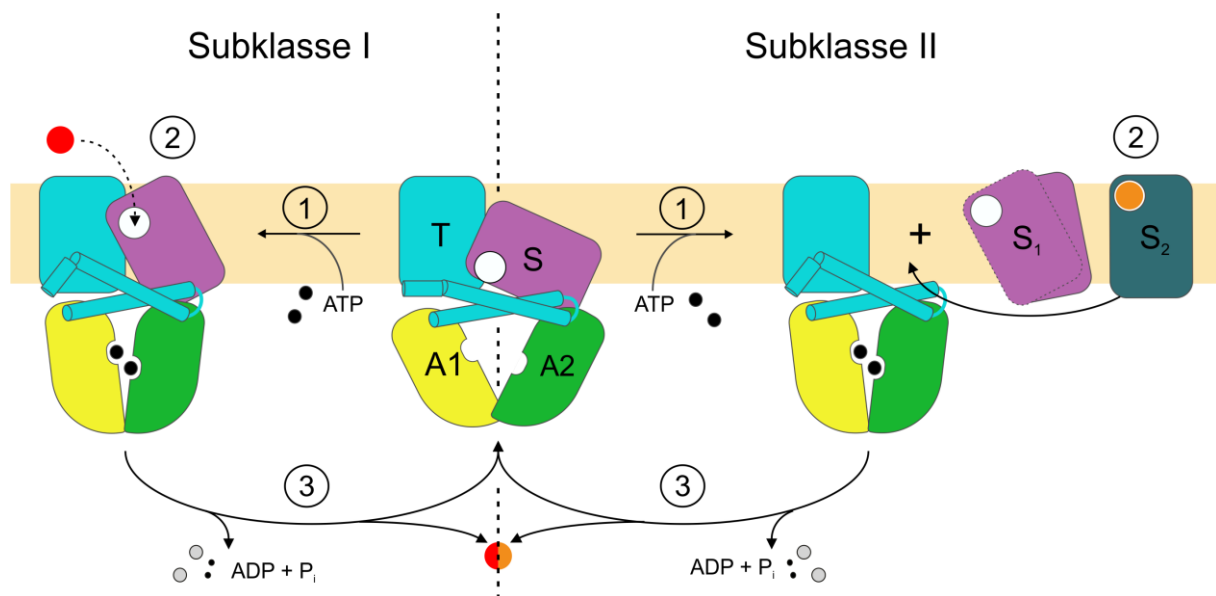


Abb. 33: Transportmechanismus für ECF-Transporter der Subklassen I und II. Die ATP-Bindung (1) führt über eine Schließbewegung des ATPase-Dimers zu einer Konformationsänderung der zytoplasmatischen Kopplungshelices der T-Komponente, in deren Folge die S-Komponente aus der gekippten in eine aufrechte Position überführt wird und Substrat binden kann (2). Für ECF-Transporter der Subklasse II wurde ein „release and catch“-Mechanismus vorgeschlagen, der nach Dissoziation der substratfreien S-Einheit die Bindung einer bereits substratbeladenen S-Einheit ermöglicht. Im Fall des in dieser Arbeit untersuchten Biotintransporters blieb die S-Einheit am Komplex verhaftet und dieser Mechanismus könnte generell für ECF-Transporter der Subklasse I zutreffen. Durch ATP-Hydrolyse (3) kippt die S-Einheit um und entlässt das Substrat ins Zytosol.

Mithilfe unterschiedlicher methodischer Ansätze konnte in der vorliegenden Arbeit der bisher hypothetische Kippmechanismus von ECF-Transportern experimentell validiert und etabliert werden. Am Beispiel von BioM₂NY wurde erstmals für einen ECF-Transporter nachgewiesen, dass die S-Einheit im Transportzyklus eine umfassende Konformationsänderung vollzieht. Trotz gravierender struktureller Unterschiede zwischen ECF-Transportern und kanonischen ABC-Importern vereint beide Systeme ein Mechanismus, der die Bindung und Hydrolyse von ATP nutzt, um Konformationsänderungen in einem Proteinkomplex zu bewirken und dadurch Substrate über die Membran zu befördern. Umso erstaunlicher ist, dass einige S-Einheiten von ECF-Transportern auch ohne den Treibstoff ATP als Transporter fungieren. Für einige BioY-Proteine wurde Transportaktivität in Abwesenheit eines Energetisierungsmoduls im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Zusammen mit den an BioM₂NY gewonnenen Erkenntnissen zur Dynamik der S-Einheit während des Transports könnte daraus ein fundamentaler Unterschied zu kanonischen ABC-Importern deutlich werden. Aufgrund der generell vergleichbaren Topologie von S-Einheiten (Eitinger et al., 2011), die solitäre BioY-Proteine mit einschließt (s. Abb. 31), ist auch für den solitären Transport ein Kippmechanismus wahrscheinlich. Ein Kippen in Abwesenheit von A- und T-Komponenten würde unterstreichen, dass die Bewegung der S-Einheit, die die Translokation des Substrates bewerkstelligt, von der ATP-Hydrolyse unabhängig ist. Tatsächlich scheint die Rolle von ATP in dem in dieser Arbeit etablierten Modell sowie in anderen Modellen (Karpowich et al., 2015; Swier et al., 2016) darin zu bestehen, die Substratbindestelle durch Aufrichten der S-Einheit nach dem Transport wieder nach außen zu befördern. Ob die ATP-Hydrolyse das Umkippen der S-Einheit antreibt oder lediglich ermöglicht, ist zwar weiterhin offen. Vorläufige Versuche, in denen BioM₂N-Komplexe und biotinbeladene BioY-Proteine separat isoliert und anschließend erfolgreich (ohne ATP) *in vitro* zu einem Komplex zusammengefügt wurden, deuten allerdings auf ein von ATP unabhängiges Umklappen hin. Sollten S-Einheiten generell eine intrinsische Fähigkeit zum Kippen besitzen, könnte die Rückkehr in die aufrechte Position der limitierende Schritt für eine Transportaktivität im solitären Zustand sein. Die solitäre Transportfunktion einiger BioY-Proteine könnte deshalb auch mit dem niedrigen Bedarf an deren Substrat erklärbar sein. Obwohl Biotin physiologisch unverzichtbar ist, werden beispielsweise in *E. coli* nur etwa 100 Moleküle pro Zelle benötigt, um die Funktion des dort einzigen biotinabhängigen Enzyms, der Acetyl-CoA-Carboxylase, zu gewährleisten (Choi-Rhee und Cronan, 2005). Für das Zellwachstum könnte es somit bereits genügen, wenn Biotin in einem vergleichsweise seltenen Ereignis über die Membran befördert wird.

4. Material und Methoden

4.1 Stämme

Zur Klonierung von Genen und zur Proteinproduktion wurden Derivate von *Escherichia coli* K-12 verwendet. Alle genutzten Stämme sind in der folgenden Liste (Tab. 1) aufgeführt.

Tab. 1: Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

<i>E. coli</i> - Stamm	Eigenschaften	Herkunft
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lacI^fZ ΔM15 Tn10], Tet^R</i>	Stratagene
BL21-Gold	<i>F⁻ Δlon ΔompT hsdS(r_B m_B) dcm⁺ gal endA Tet^R</i>	Stratagene
UT5600	<i>araC14 leuB6(Am) secA206(aziR) lacY1 proC14 tsx-67 Δ(ompT-fepC)266 antA403 glnX44(AS) λ⁻ trpE38 rfbC1 rpsL109(strR) xylA5 mtl-1 thiE1</i>	New England Biolabs
<i>ΔbioH</i> <i>ΔyigM::km</i>	<i>F⁻ Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 ΔyigM772::km ΔbioH</i>	Diese Arbeit

4.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide sind Derivate von pBluescript II KS(+) (Stratagene) und wurden ausgehend von pRcBioY-HF (Hebbeln et al., 2007), pRcBioMNY-HMF oder pRcBioMNY-HMF *Cys-less* (Neubauer et al., 2011) konstruiert. Die Bezeichnung „-HMF“ bezieht sich auf die Nukleotidsequenzen für das Deka-Histidin-Tag, das cMyc-Tag und das FLAG-Tag. „-S“ kennzeichnet eine Strep-Tag-odierende Sequenz. Die Genexpression von pBluescript-Derivaten unterliegt der Kontrolle des Lac-Promotors, weshalb die Expressionsplasmide mit den Hilfsplasmiden pFDX500 (Schnetz und Rak, 1990) oder pLacI-RARE2 (Novagen) kombiniert wurden, die beide das für den Lac-Repressor codierende *lacI*-Allel tragen. Letztgenanntes Plasmid codiert außerdem für 7 tRNAs zur verbesserten Expression von Genen mit Codons, für die *E. coli* keine tRNAs besitzt. Die Ampicillinresistenz auf pBluescript II KS(+) wird durch das für eine β-Lactamase codierende Gen *bla* vermittelt,

Streptomycinresistenz durch das Adenylyltransferase-Gen *aadA*. Die für die λ Red-Enzyme und die Flp-Rekombinase codierenden Gene *bet* *exo* *gam* und *flp* wurden über die Ampicillinresistenz vermittelnden Plasmide pSIM6 (Sharan et al., 2009) und pCP20 (Cherepanov und Wackernagel, 1995) bereitgestellt, welche beide einen temperatursensitiven Replikationsursprung (pSC101ts) besitzen. Die Expression der Gene unterliegt dort der Kontrolle des λ p_L-Promotors mit dem temperatursensitiven Repressor c₁₈₅₇ des λ -Phagen. Diese Plasmide wurden freundlicherweise von Donald L. Court (Frederick, MD) zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Plasmide sowie ihre Herkunft und Eigenschaften sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pFDX500	<i>oriP15A</i> , <i>aph(3')</i> (Km ^R), <i>lacI</i> ^q	Schnetz und Rak (1990)
pLacI-RARE2	<i>oriP15A</i> , <i>lacI</i> , <i>cam</i> (Cm ^R)	Novagen
pSIM6	<i>pSC101ts ori (rep^{ts})</i> , <i>bla</i> (Ap ^R), <i>[c1857] (λ)(ts)</i> , <i>gam bet</i> <i>exo</i>	Sharan (2009)
pCP20	<i>pSC101ts ori (rep^{ts})</i> , <i>bla</i> (Ap ^R), <i>[c1857] (λ)(ts)</i> , <i>flp</i>	Cherepanov und Wackernagel (1995)
pBluescript II KS(+)	ColE1 <i>ori</i> , <i>bla</i> (Ap ^R), <i>lacZ'</i> , <i>P_{lac}</i>	Stratagene
pRcBioMNY-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG; Derivat von pRcBioMNY-HF (Hebbeln et al., 2007)	Neubauer et al. (2011)
pRcBioMNY-HMF Cys-less	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG; cysteinfrei	Neubauer et al. (2011)
pRcBioY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY</i> , FLAG	Hebbeln et al. (2007)
pAtBioMNY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNY</i> , FLAG; aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58	Laborsammlung
pAtBioMNY-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pAtBioY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY</i> , FLAG	F. Kirsch (2015)
pSmBioMNY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNY</i> , FLAG; aus <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Laborsammlung
pSmBioMNY-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pSmBioY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY</i> , FLAG	F. Kirsch (2015)
pBjBioY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY</i> aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, FLAG	F. Kirsch (2015)
pRdBioY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY</i> aus <i>Roseobacter denitrificans</i> OCh 114, FLAG	F. Kirsch (2015)
pRnBioY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY</i> aus <i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM, FLAG	F. Kirsch (2015)
pRpBioY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY</i> aus <i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009, FLAG	F. Kirsch (2015)

pObBioY1-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY1</i> aus <i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597, FLAG	F. Kirsch (2015)
pObBioY2-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY2</i> aus <i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597, FLAG	F. Kirsch (2015)
pSpBioY1-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY1</i> aus <i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3, FLAG	F. Kirsch (2015)
pSpBioY2-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY2</i> aus <i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3, FLAG	F. Kirsch (2015)
pBjBioY _{K166R} -HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY_{K166R}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRdBioY _{K205R} -HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY_{K205R}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pObBioY2 _{D178N,K181R} -HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY_{D178N,K181R}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pSpBioY2 _{D166N,K189R} -HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY_{D166N,K189R}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pPimA-HF	Sm ^R , Deka-His, <i>pimA</i> aus <i>Rhodospseudomonas palustris</i> CGA009, FLAG	F. Kirsch (2015)
pRcBioME _{161Q} NY-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioME_{161Q}N</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{143C} Y-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{143C}</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{147C} Y-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{147C}</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNY _{A12V} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A12V}</i> , FLAG	C. Kiesler (2013)
pRcBioMNY _{A13V} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A13V}</i> , FLAG	C. Kiesler (2013)
pRcBioMNY _{A12W} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A12W}</i> , FLAG	C. Kiesler (2013)
pRcBioMNY _{A13W} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A13W}</i> , FLAG	C. Kiesler (2013)
pRcBioMNY _{V16W} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{V16W}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNY _{A17W} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A17W}</i> , FLAG	C. Kiesler (2013)
pRcBioMNY _{A12W,V16W} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{V16W,A17W}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNY _{A12C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A12C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNY _{A13C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A13C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNY _{V16C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{V16C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNY _{A17C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A17C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{143C} Y _{A12C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{143C}</i> , cMyc, <i>bioY_{A12C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{143C} Y _{A13C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{143C}</i> , cMyc, <i>bioY_{A13C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{143C} Y _{V16C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{143C}</i> , cMyc, <i>bioY_{V16C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{143C} Y _{A17C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{143C}</i> , cMyc, <i>bioY_{A17C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{147C} Y _{A12C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{147C}</i> , cMyc, <i>bioY_{A12C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{147C} Y _{A13C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{147C}</i> , cMyc, <i>bioY_{A13C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{147C} Y _{V16C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{147C}</i> , cMyc, <i>bioY_{V16C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMNV _{147C} Y _{A17C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMNV_{147C}</i> , cMyc, <i>bioY_{A17C}</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMD _{86C} NY-HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMD_{86C}N</i> , <i>bioY</i> , FLAG	Neubauer <i>et al.</i> (2011)
pRcBioMH _{87C} NY-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMH_{87C}N</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMQ _{88C} NY-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMQ_{88C}N</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	O. Neubauer (2013)
pRcBioMNY _{L26C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{L26C}</i> , FLAG	M. Grunzel (2015)
pRcBioMNY _{K137C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{K137C}</i> , FLAG	M. Grunzel (2015)
pRcBioMNY _{A152C} -HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN</i> , cMyc, <i>bioY_{A152C}</i> , FLAG	M. Grunzel (2015)
pRcBioY _{L26C} -HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY_{A17C}</i> , FLAG	M. Grunzel (2015)

pRcBioY _{K137C} -HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY_{K137C}</i> , FLAG	M. Grunzel (2015)
pRcBioY _{A152C} -HF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioY_{A152C}</i> , FLAG	M. Grunzel (2015)
pRcBioM _{D86N} NY-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioM_{D86N}</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioM _{D86K} NY-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioM_{D86K}</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcBioMN _{R141E} Y-HMF	Ap ^R , Deka-His, <i>bioMN_{R141E}</i> , cMyc, <i>bioY</i> , FLAG	Diese Arbeit
pRcCbi(MN)QO-S	Ap ^R , <i>cbi(MN)QO</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert	Siche <i>et al.</i> (2010)
pRcCbi(M _{M4C} N)QO-S	Ap ^R , <i>cbi(M_{M4C}N)QO</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert	Diese Arbeit
pRcCbi(M _{C67S} N)QO-S	Ap ^R , <i>cbi(M_{C67S}N)QO</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert	Diese Arbeit
pRcCbi(M _{C67T} N)QO-S	Ap ^R , <i>cbi(M_{C67T}N)QO</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert	Diese Arbeit
pRcCbi(MN)-S	Ap ^R , <i>cbi(MN)</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert	Siche <i>et al.</i> (2010)
pRcCbi(M _{H2D} N)-S	Ap ^R , <i>cbi(M_{H2D}N)</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert und Metallbindestelle ist inaktiv	Siche <i>et al.</i> (2010)
pRcCbi(M _{M4C} N)-S	Ap ^R , <i>cbi(M_{M4C}N)</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert	Diese Arbeit
pRcCbi(M _{C67S} N)-S	Ap ^R , <i>cbi(M_{C67S}N)</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert	Diese Arbeit
pRcCbi(M _{C67T} N)-S	Ap ^R , <i>cbi(M_{C67T}N)</i> , Strep, CbiMN sind fusioniert	Diese Arbeit
pRcCbiM-S	Ap ^R , <i>cbiM</i> , Strep	Siche <i>et al.</i> (2010)

4.3 Kultivierung von Bakterienstämmen

Alle Stämme wurden in LB-Medium (*lysogeny broth*) (Bertani, 1951) oder Mineralmedium unter Zugabe entsprechender Antibiotika kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C oder 30 °C (s. Abschnitt 4.12). Flüssigkulturen wurden im Maßstab von 10 ml bis 2 l in Erlenmeyerkolben im Wasserbad oder Inkubationsschüttler (New Brunswick) angezogen.

4.3.1 Nährmedien

Die in Tab. 3 aufgelisteten Medienkomponenten wurden in vollentsalztem (VE-) Wasser aufgelöst und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung von Mineralmedien wurden die Komponenten einzeln autoklaviert oder sterilfiltriert und steril zusammengefügt. Für Agarplatten wurden dem Medium 1,5 % (w/v) Agar-Agar hinzugefügt.

Tab. 3: Zusammensetzung verwendeter Nährmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium (Vollmedium)	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,25 % (w/v) NaCl
GN-Medium (Mineralmedium)	20 mM Glukose 37,5 mM NH ₄ Cl

	810 μM MgSO_4 68 μM CaCl_2 , 18,5 μM FeCl_3 35 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,0)
--	--

4.3.2 Antibiotika

Zur selektiven Kultivierung von Bakterienstämmen mithilfe von Resistenzmarkern wurden allen Nährmedien entsprechende Antibiotika zugesetzt (s. Tab. 4). Diese wurden als Stammlösungen eingewogen und sterilfiltriert (0,22 μm Porengröße).

Tab. 4: Konzentration verwendeter Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H_2O	100 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol	34 mg/ml in 96 % (v/v) Ethanol	34 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	50 mg/ml in H_2O	50 $\mu\text{g/ml}$
Streptomycin	50 mg/ml in H_2O	50 $\mu\text{g/ml}$
Tetracyclin	10 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol	10 $\mu\text{g/ml}$

4.3.3 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte (Extinktion der Zellsuspension) bei einer Wellenlänge von 578 nm ermittelt. Zellen wurden zweimal mit Phosphatpuffer (35 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,0) gewaschen und zur Messung im Photometer (Biochrom Libra S12) so verdünnt, dass die OD_{578} zwischen 0,1 und 0,5 lag.

4.3.4 Aufzeichnung des bakteriellen Wachstumsverlaufes

Zum Nachweis von Biotintransportprozessen wurde das Wachstumsverhalten eines intrinsisch biotinauxotrophen und -aufnahmedefizienten Indikatorstammes (vgl. Abschnitt 2.1) unter Produktion potentieller Biotintransporter bei Biotinlimitation aufgezeichnet. Zellen einer Übernachtskultur (in Mineralmedium mit entsprechenden Antibiotika und 1 μM Biotin) wurden dreimal mit sterilem Phosphatpuffer (35 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,0) gewaschen, in Mineralmedium auf eine OD_{578} von 0,1 verdünnt und bis zum Erreichen des maximalen Wachstums bei 37 °C weiter inkubiert. Nach erneuter Bestimmung der OD_{578} wurden die Zellen in Mineralmedium ohne bzw. mit 1 nM oder 1 μM Biotin auf eine OD_{578} von 0,05 verdünnt.

200 µl der Zellsuspensionen wurden in die Vertiefungen einer sterilen 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte gegeben und diese mit einem atmungsaktiven Schutzfilm überzogen. Die weitere Inkubation bei 37 °C und stündliche Bestimmung der optischen Dichte erfolgten im Mikroplatten-Lesegerät (SpectraMax M2, Molecular Devices, MTX Lab Systems, Inc., USA). Aus technischen Gründen wurde im Mikroplatten-Lesegerät eine OD₆₀₀ gemessen.

4.4 Konservierung von Bakterienstämmen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 800 µl einer Übernachtskultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit 250 µl 86 %igem (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

4.5 DNA-Isolierung

4.5.1 Isolierung von Gesamt-DNA nach Chen & Kuo

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-DNA aus *E. coli* wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur (LB-Medium mit 0,4 % [w/v] Glukose) abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl Lysispuffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 20 mM Natriumacetat, mit Essigsäure auf pH 7,8) aufgenommen. Nach Aussalzen der Proteine mit 66 µl 5M NaCl erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 12000 x g, 4°C) zur Abtrennung präzipitierter Proteine und Zelltrümmer. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, [v:v]) bis zum Erscheinen einer homogenen, milchigen Trübung ausgeschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 12000 x g) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die darin gelöste DNA mit dem doppelten Volumen 100 %igen (v/v) Ethanol gefällt und zweimal mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend an der Luft getrocknet und in 40 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA-di-Natriumsalz, pH 8) aufgenommen.

4.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmidpräparation erfolgte mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) von Qiagen entsprechend dem dazugehörigen Protokoll. Dabei wird nach alkalischer Lyse, Präzipitation

und Abtrennung von Proteinen, chromosomaler DNA und Zelltrümmern die Plasmid-DNA über eine Silica-Matrix isoliert. Die Konzentration gereinigter Plasmid-DNA wurde mithilfe eines NanoDrop-Spektrophotometers (ThermoFisher Scientific) bestimmt und lag im Bereich von 50-150 µg/ml.

4.6 Enzymatische Modifikation von DNA

4.6.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten und wurde zur ortsspezifische Mutagenese eingesetzt (s. Abschnitt 4.11.2). Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme mit den entsprechenden Anwendungen aufgeführt. Eingesetzt wurden die Platinum™ Pfx DNA-Polymerase von Invitrogen™ (ThermoFisher Scientific) sowie LongAmp® Taq DNA-Polymerase, Phusion® DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) von NEB (New England Biolabs). Oligonukleotide (Primer) wurden über SMB (Services in Molecular Biology GmbH) bezogen.

Zur Erzeugung eines für die λRed-vermittelte Rekombination geeigneten Donor-DNA-Fragmentes wurde ein 100 µl-Ansatz mit Pfx-Puffer (NEB), 5 µl gereinigter chromosomaler DNA, 1 mM MgSO₄, 100 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer (#FK89, #FK83), 0,4 mM dNTPs und 1 U Pfx DNA-Polymerase mit dem in Tab. 5 aufgeführten Programmablauf eingesetzt.

Tab. 5: PCR-Programm zur Erzeugung der Donor-DNA für λRed-vermittelte Rekombination.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	92 °C	10 min
2. Denaturierung	92 °C	15 s
3. Primer- Anlagerung	58°C	30 s
4. Elongation	72 °C	2 min
5. Wiederholung ab Schritt 2		34 x
6. Terminale Elongation	72 °C	10 min
7. Ende	12 °C	unbegrenzt

Die Amplifikation von Sequenzabschnitten, die für einen analytischen Restriktionsverdau zur Überprüfung von Klonierungsprodukten geeignet waren, erfolgte mithilfe einer Kolonie-PCR oder mit isolierter Plasmid-DNA nach dem in Tab. 6 aufgeführten Programmablauf. Etwas Koloniematerial wurde mit einem sterilen Zahnstocher in 20 µl sterilem H₂O gekocht und 1 µl der Zellsuspension in einen 20 µl-PCR-Ansatz überführt. Alternativ wurden etwa 50 pmol isolierter Plasmid-DNA eingesetzt. PCR-Ansätze enthielten LongAmp®-Puffer, 0,4 mM dNTPs, 1 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie 1 U LongAmp® DNA-Polymerase. Zur Amplifikation von Genen auf dem pBluescript II KS(+)-Vektorsystem wurden entweder die M13-Primer, die vor und hinter der *multiple cloning site* hybridisieren, oder spezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer (s. Tab. 8) verwendet.

Tab. 6: Programmablauf für die Kolonie-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2. Denaturierung	95 °C	15 s
3. Primer- Anlagerung	55°C	30 s
4. Elongation	68 °C	2 min
5. Wiederholung ab Schritt 2		30 x
6. Terminale Elongation	68 °C	10 min
7. Ende	12 °C	unbegrenzt

Ortsspezifische Mutagenese (vgl. Abschnitt 4.11.2) wurde mithilfe von zwei aufeinander folgenden PCR-Läufen erzielt. PCR-Ansätze der ersten PCR enthielten Phusion®-Puffer, 0,4 mM dNTPS, 1 µM Primer, 1 U Phusion® DNA-Polymerase und etwa 10 - 50 pmol Plasmid-DNA. Ansätze für die zweite PCR-Runde enthielten etwa 5 pmol des ersten PCR-Produktes. Häufig wurde hierzu das in Tab. 7 aufgeführte *Touch Down*-Protokoll durchgeführt. Bei bekannter Anlagerungstemperatur für die Primer konnte auf die Schritte 3-6 verzichtet werden.

Tab. 7: Programmablauf für die *Touch Down*-PCR zur ortsspezifischen Mutagenese.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
2. Denaturierung	98 °C	10 s
3. Primer-Anlagerung	70 °C – 1K/Zyklus	30 s
4. Elongation	72 °C	20 – 60 s
5. Wiederholung ab Schritt 2		20 mal
6. Denaturierung	98 °C	10 s
7. Primer-Anlagerung	55 - 65 °C	30 s
8. Elongation	72 °C	20 – 60 s
9. Wiederholung ab Schritt 6		30 mal
10. Terminale Elongation	72 °C	10 min
11. Ende	12 °C	unbegrenzt

In Tab. 8 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet.

Tab. 8: Oligonukleotide (Primer).

Nr.	Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung
PH4	BioY-Bgl(-)	GCGCAGATCTGCCGCGGGCGAGCAGCGCCGAG
PH5	BioM-Bgl(-)	GCGAGATCTGCATGCGCCCGCCGCGCCAAAGC
PH8	BioY-NcoI(+)	GCGCCATGGTGAGCCTCGCGCTGCCCTGTCTG
PH24	ReCbiN_BglII(-)	GCGAGATCTTTCCGCGGGGAAGGACC
PH74	M13_47 Forward	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC
PH58	M13 Reverse	GGAAACAGCTATGACCATG
FK2	AtBioY_rev	CCGAGATCTGGCGCGCTGCGGCAGCA
FK19	SmBioY_rev	GCGGGATCCGACGCGCGCCGGCAG
FK81	bioHtestfor	CTGCCATAACGGAACGCTGACGATGCG
FK82	bioHtestrev	GGCCTGCTTATTAAGTAGTGGATACGC
FK78	yigMfor	TGATACTTCGCTACAATGGATACCCG
FK80	metRfor_yigMtest	ATGATCGAAGTAAACACCTGAAAACGC
FK83	yigMrev	CGAGCAGCGTCAGCCAGTTACGGAAGC
FK136	AtBioNcMyc_for	GCGAGGACCTGTGATGAGCGCCATGACGACCCGCGAC

FK137	AtBioNcMyc_rev	GCGAGGTCCTCTTCGCTAATCAGTTTCTGTTCTAACTCCGGATGGTTGTCTG G
FK142	SmBioNcMyc_for	GCGAGGACCTGTGATTCGCGCTTTCTAATAAGAGGTA
FK143	SmBioNcMyc_rev	GCGAGGTCCTCTTCGCTAATCAGTTTCTGTTCTTGACGGCCGAAATCCCCCTG TC
FK138	AtBioYA17W	AAGTGCGATGATGATCCAGGAAAACAGCGAAAT
FK139	AtBioYA21W	CGGCGGCAGCAGCCCCAGCCAGATGATGATGGCGGA
FK140	AtBioYA17WA21W	CAGCCAGATGATGATCCAGGAAAACAGCGAAAT
FK141	AtBioNmutfor	AGGCCAAAGCTTTCGGCCAGACAACCA
FK144	SmBioYA14W	GAGCACGACGATGATCCAAGTGAAAAGCGCGAC
FK145	SmBioYV18W	CGGTACGAGGCCGAGCCAGACGATGATGGCAGT
FK146	SmBioYA14WV18W	GAGCCAGACGATGATCCAAGTGAAAAGCGCGAC
FK147	SmBioNmutfor	CCTCGGTCTCCTGAGGGCGGCAGATGT
FK95	Bj_Y_mutfor	GCGGCCTCGCTGGTCCGCAACGCGCTGGGCGCG
FK96	Ob_Y2_mutfor	ATCGGCGATCTGCTGCGTCTCGCCCTGGCCGC
FK97	Sp_Y2_mutfor	GCTGGCGATCTGGTCCGCGTCACGCTGGCAGCC
FK98	Rd_Y_mutfor	CTGGGCGATGCGCTCCGCCTGCTGCTGGCGGCC
FK126	ObY2_D178Nfor2	CCCTTCATCATCGGTAACCTGCTGCGTCTCGCC
FK127	SpY2_D166Nfor	CCCTTTGTGGCTGGCAACCTGGTCCGCGTCACG
2	RcBioNV143C_for	ATTTCGGTGGCTTTGTGCATCCGCTTCGTGCCG
3	RcBioNV147C_for	TTGGTGATCCGCTTCTGCCCCGTTCTGCGCGCC
4	RcBioYA13C_rev	CAGCGCGACGATCAGACACGCGAAAAGCCCGAT
5	RcBioYA17C_rev	GGGCACGAAGCCCAGACAGACGATCAGCGCCGC
6	bioH_for-PciI	GCGACATGTATAACATCTGGTGGCAGACCAAAG
7	bioH_rev-XbaI	CGCTCTAGACCTACACCCTCTGCTTCAACGCCA
8	yigM_for-NcoI	GCGCCATGGCGCTACTTATCATCACCACGATTC
9	yigM_rev-XbaI	CGCTCTAGACTTATTCGCTCAGCGCGCAATCAC
10	RcBioY_A16Wrev	CACGAAGCCCAGCGCCAGATCAGCGCCGCGAA
11	RcBioY_A16Crev	CACGAAGCCCAGCGCGCAGATCAGCGCCGCGAA
12	RcBioY_A12Crev	CGCGACGATCAGCGCGCAGAAAAGCCCGATCAG
13	RcBioY_A12W 16Wrev	CACGAAGCCCAGCGCCAGATCAGCGCCGAGAA

14	RcBioM_E161Q_for	CGCGGATCCTGTTCGACCAGCCCTTCAACGCGC
16	RcBioM_D86N_for	GTTGTTCCAGAACCCCAACCATCAGATCATCTTTCC
20	RcBioY_K137C_for	GGCTTCTGGCTGGTGTGCAACGCCGGGCTGAAA
21	RcBioY_A152C_for	CCGATCAGCCTTTGGTGC GCGACCGCGATCATG
22	RcBioM_D86K_for	TTGTTCCAGAACCCCAAACATCAGATCATCTTT
23	RcBioY_L26C_rev	ATCGGCACGCCAAAGCCGCACGGAATCGCGGGCAC
24	RcBioM_H87C_for	TTCCAGAACCCCGATTGTCAGATCATCTTTCCG
25	RcBioM_R141E_for	CTCTCGCAGGGGCAGGAACAGCTTTTGTGCCTG
34	RcBioM_C67T_rev	GCCGGTCGGATGCGAGGTCGAGCCGGTGACGGAC
35	RcBioM_C67S_rev	GCCGGTCGGATGCGACGACGAGCCGGTGACGGAC
36	RcCbiM_M4C_for	TAGCCCATGCATATCTGCGAGGGCTATCTG

4.6.2 Restriktion

Zur gezielten enzymatischen Spaltung doppelsträngiger DNA wurden die Typ II-Restriktionsendonukleasen NcoI, BglII, BspEI, XbaI, Bsu36I, PciI, PpuMI, BlnI, MscI, BamHI, NdeI, Hpy99I, Hpy188I, Hpy188III und BstNI von NEB (New England Biolabs) verwendet. Es erfolgt ein Schnitt an einer palindromischen Erkennungssequenz mit einem 5'-Überhang von ein bis vier Basen. Am 5'-Ende verbleibt die Phosphatgruppe. Ausnahmen bilden Hpy99I und Hpy188I, welche einen 3'-Überhang erzeugen, sowie MscI, welches ohne Überhang schneidet. Die Inkubation erfolgte für zwei bis drei Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur. Für präparative Zwecke wurden Ansätze im Maßstab von 30 bis 50 µl, zur analytischen Restriktion Volumina von 10 bis 20 µl angefertigt. Dazu wurden etwa 5 U des jeweiligen Enzyms in der entsprechenden Pufferlösung mit 100 bis 400 µg DNA eingesetzt.

4.6.3 Ligation

DNA-Fragmente wurden mit der T4-DNA-Ligase von NEB ligiert. 20 µl-Ansätze enthielten 200 U Ligase und jeweils etwa 50 ng Insert- und Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 5:1. Ligiert wurde über Nacht bei 16 °C.

4.7 Agarose-Gelelektrophorese

Alle DNA-Fragmente lagen in der Größenordnung von 500 bis 6000 bp. Für die elektrophoretische Auftrennung kleinerer Fragmente wurde ein 2 %iges, für größere Fragmente ein 1 %iges (w/v) Agarose-Gel (Biozym LE Agarose in TPE-Puffer: 90 mM Tris, 85 % [v/v] ortho-Phosphorsäure pH 7.5, 10 mM EDTA) verwendet. Die Laufzeit betrug 50 bis 60 Minuten bei 100 V. Für analytische Zwecke wurden 5 µl, für präparative Zwecke Volumina von bis zu 50 µl mit dem fünften Volumenanteil DNA-Probenpuffer (6fach konzentriert: 50 % [v/v] Glycerin, 1 mM EDTA, 0,07 % [w/v] Bromphenolblau in TPE-Puffer) versetzt und aufgetrennt. Als Referenz diente der 2-Log DNA-Marker von NEB. Die ihrer Größe nach aufgetrennten Fragmente wurden mithilfe des DNA-interkalierenden Färbemittels Gel-Red (0,1 % [v/v], Biotium) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

4.8 Reinigung von PCR-Produkten und anderen DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mithilfe des GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kits (EURx über ROBOKLON GmbH) aus dem Agarosegel präpariert. War keine Trennung verschiedener Fragmente nötig, erfolgte eine Reinigung über das „GeneMATRIX PCR/DNA Clean-up DNA Purification Kit“ (EURx über ROBOKLON GmbH).

4.9 Herstellung chemisch kompetenter Zellen und Transformation

Die Aufnahme externer DNA-Moleküle durch bakterielle Zellen setzt die sogenannte Kompetenz voraus. Während natürliche Kompetenz bei *E. coli* nicht bekannt ist, kann eine chemische Kompetenz durch Inkubation mit MgCl_2 induziert werden. Zellen einer Übernachtskultur in LB-Medium wurden dazu 1:100 in 20 ml LB-Medium überimpft und bis zum Erreichen des exponentiellen Wachstums ($\text{OD}_{578} \sim 0,5$) bei 37 °C weiter inkubiert. Die Zellen wurden für zehn Minuten bei 4500 rpm und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in 5 ml sterilem, eiskaltem Kompetenzpuffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 , pH 7,5) vollständig resuspendiert und nach zweistündiger Inkubation auf Eis erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml eiskaltem Kompetenzpuffer mit 0,5 ml sterilem

Glycerin (87 % [v/v]) resuspendiert und sofort zur Transformation verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

Zur Transformation wurden 200 µl-Aliquots chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit 20 µl-Ligationsansätzen ober 50 - 100 ng Plasmid-DNA versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60 s bei 42 °C im Thermoblock (PeqLab Thriller) wurden die Zellen kurz auf Eis gekühlt, anschließend mit 1 ml LB-Medium versetzt und für ein bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen bei 6000 rpm für 5 min abzentrifugiert, das Pellet im verbleibenden Medium resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Antibiotikaresistente Transformanten wurden nach Inkubation bei 37 °C am kommenden Tag weitergehend untersucht.

4.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von *in vitro* synthetisierten DNA-Abschnitten erfolgte durch die Firma SMB (Services in Molecular Biology GmbH) mit 2 µg isolierter Plasmid-DNA nach der Sanger-Methode (Sanger und Coulson, 1975).

4.11 Konstruktion der Plasmide

4.11.1 Herstellung von BioM₂NY-Varianten aus *A. tumefaciens* und *S. meliloti* mit C-terminalem cMyc-Tag an BioN

Um die BioN-Untereinheiten aus *A. tumefaciens* und *S. meliloti* im Western-Blot nachweisen zu können, wurde C-terminal ein cMyc-Tag (EQKLISEEDL) an die Proteine angefügt. Dazu wurde die für cMyc codierende Sequenz, wie von Neubauer *et. al* für BioN aus *R. capsulatus* beschrieben, ans 3'-Ende der *bioN*-Gene in das *bioMNY*-Operon inseriert (Neubauer et al., 2011). In einer inversen PCR wurde zunächst das gesamte Plasmid pAtBioMNY-HF bzw. pSmBioMNY-HF amplifiziert (Primer #FK136 und #FK137 bzw. #FK141 und #FK142), sodass an den 5'-Überhängen überlappende cMyc-Sequenzen entstanden, die jeweils eine PpuMI-Schnittstelle enthielten. Nach Restriktion mit PpuMI und Ligation der kompatiblen Enden wurden die geschlossenen Konstrukte, die nun am 3'-Ende von *bioN* die cMyc-Sequenz trugen, mit BspEI und BglII (bei den Genen aus *A. tumefaciens*) bzw. Bsu36I und XbaI (bei den Genen aus *S. meliloti*) verdaut und in die ebenso behandelten Elternplasmide mit

wildtypischen *bioMNY*-Genen ligiert. Die Korrektheit der inserierten Sequenzen mit 615 bp und 873 bp Länge wurde mittels Sequenzierung überprüft.

4.11.2 Erzeugung von Aminosäureaustauschen

Zur Substitution einzelner Aminosäuren wurden die jeweiligen Codons im codierenden Gen entsprechend verändert. Basenaustausche wurden über zwei hintereinander folgende Polymerasekettenreaktionen (PCR) erzielt. Die erste PCR erfolgte zunächst mit einem Mutagenese-Primer, der den gewünschten Basenaustausch enthielt, und einem in der Nähe hybridisierenden Primer. Der zweite Primer wurde so gewählt, dass ein Amplifikat mit dem Basenaustausch und einer flankierenden Restriktionsschnittstelle entstand. Dieses in der Regel zwischen 200 und 300 bp große Produkt diente als Primer für eine zweite PCR in Kombination mit einem dritten Primer, der so gewählt wurde, dass das resultierende Amplifikat den gewünschten Basenaustausch in Flankierung von nun zwei Restriktionsschnittstellen trug. Das Produkt wurde anschließend mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen behandelt und in einen ebenso geöffneten Vektor im Austausch gegen den wildtypischen Sequenzabschnitt eingefügt. Die Korrektheit der *in vitro* synthetisierten Abschnitte wurde per Sequenzierung bestätigt.

4.11.2.1 Aminosäureaustausche in *AtBioY* und *SmBioY*

Zur Herstellung der Aminosäureaustausche A17W und A21W in *AtBioY* bzw. A14W und V18W in *SmBioY* wurden die jeweiligen wildtypischen Gene von den Plasmiden *AtBioMNY-HMF* bzw. *pSmBioMNY-HMF* mit Primern amplifiziert, die veränderte Codons einfügten. Die erste PCR erfolgte mit den in 3'-5'-Richtung bindenden Mutagenese-Primern #FK138 oder #FK139 (beide *AtbioY*) bzw. #FK144 oder #FK145 (beide *SmbioY*) und den in 5'-3'-Richtung hybridisierenden Primern #FK141 bzw. #FK147. Die Produkte dieser PCR dienten in einer zweiten PCR als Primer in Kombination mit dem Primer #FK2, der am 3'-Ende des *bioY*-Gens aus *A. tumefaciens* hybridisiert, bzw. dem M13-for-Primer (#PH74), der hinter *bioY* von *S. meliloti* auf dem Vektor hybridisiert. Die Amplifikate wurden mit BspEI und BglII bzw. Bsu36I und XbaI behandelt und die resultierenden 615 bp und 873 bp langen Abschnitte zum Austausch der entsprechenden wildtypischen Bereiche verwendet. Die Herstellung von *AtbioY*- und *SmbioY*-Allelen mit A17W/A21W- bzw. A14W/V18W-Phänotyp erfolgte in analoger Weise basierend auf den vorhergehend hergestellten Allelen mit den einzelnen veränderten Codons

für A21W (*AtbioY*) mit dem Mutagenese-Primer # FK140 und A18W (*SmbioY*) mit dem Mutagenese-Primer #FK146.

4.11.2.2 Aminosäureaustausche in *RcBioM*

Zur Erzeugung des E161Q-Austausches in *RcBioM* wurde der codierende DNA-Abschnitt auf dem Plasmid pRcBioMNY-HMF mit dem Mutagenese-Primer #14 und dem M13-for-Primer (#PH74), der auf dem Vektorrückgrat von pBluescript II KS(+) rückwärts gerichtet hinter dem Operon hybridisiert, amplifiziert. Produkt enthielt das Gln-Codon in Flankierung von BamHI- und NdeI-Erkennungssequenzen. Durch Behandlung mit NdeI und BamHI entstand ein Abschnitt von 796 bp Länge, der gegen den entsprechenden wildtypischen Abschnitt auf dem Plasmid pRcBioMNY-HMF ausgetauscht wurde. Allele, die für BioM mit den Einzelaustauschen D86K, D86N und H87C codierten, wurden in einer ersten PCR mit den Mutagenese-Primern #16, #22 und #24 und dem Primer #ON15, der im Bereich der BamHI-Erkennungssequenz in *bioM* in 3'-5'-Richtung hybridisiert, mit *bioMNY* als Matrize erzeugt. Für den R141E-Austausch wurde *bioM* mit dem Mutagenese-Primer #25 und dem rückwärts gerichteten Primer #PH5, der am 3'-Ende von *bioM* hybridisiert, erzeugt. Als Matrize dienten wildtypisches *bioMNY* (pRcBioMNY-HMF) bzw. für den H87C-Austausch ein Konstrukt, das keine Cys-Codons enthielt (*Cys-less*) und in einer früheren Arbeit durch Olivia Neubauer hergestellt worden war (Neubauer et al., 2011). In einer zweiten PCR wurden diese Amplifikate je als rückwärts gerichteter Primer in Kombination mit dem M13-rev-Primer (#PH58) eingesetzt, der vor dem Startcodon in 5'-3'-Richtung auf dem Vektor hybridisiert. Die entstandenen Produkte enthielten die veränderten Codons in Flankierung von NcoI und BamHI. Behandlung mit diesen Restriktionsendonukleasen erzeugte ein Produkt von 471 bp Länge, das gegen die entsprechenden Abschnitte auf pRcBioMNY-HMF mit wildtypischem oder cysteinfreiem Hintergrund ausgetauscht wurde.

4.11.2.3 Aminosäureaustausche in *RcBioN*

Die Erzeugung von Allelen, die für die BioN-Einzelsysteinvarianten V143C und V147C codierten, erfolgte per PCR auf dem Plasmid pRcBioMNY-HMF (*Cys-less*) mit den vorwärts gerichteten Mutagenese-Primern #2 bzw. #3 in Kombination mit dem Primer #ON39, der am 3'-Ende von *bioN* in 3'-5'-Richtung hybridisiert. In einer zweiten PCR wurden die PCR-Produkte jeweils als Primer in Kombination mit dem M13-rev-Primer (#PH58) eingesetzt. Die

entstandenen Amplifikate wurden mit MscI und PpuMI behandelt im Austausch gegen den entsprechenden cysteinfreien Abschnitt in den ebenso geöffneten Vektor eingefügt.

4.11.2.4 Einzelaminosäureaustausche in *RcBioY*

Zum Austausch einzelner Aminosäuren in der ersten Helix von BioY (A12C, A13C, V16W, V16C, A17C) wurde *bioMNY* mit in 3'-5'-Richtung hybridisierenden Mutagenese-Primern (#4, #5, #10, #11, #12, #13) und einem in *bioN* bindenden Vorwärts-Primer (#ON37) amplifiziert. In einer zweiten PCR wurden diese PCR-Produkte als Primer in Kombination mit dem M13-for-Primer (#PH74), der in 3'-5'-Richtung hinter *bioY* hybridisiert, eingesetzt. Die Amplifikate wurden mit PpuMI und XbaI oder NdeI und XbaI gespalten und in die gleichermaßen geöffneten Vektoren im Austausch gegen den wildtypischen oder cysteinfreien Abschnitt (zur Erzeugung von Einzelcysteinvarianten) eingesetzt. Zur Herstellung der BioY-Einzelcysteinvarianten K137C, A152C und L26C wurde *bioY* mit den Mutagenese-Primern #20, #21 (5'-3') oder #23 (3'-5') und dem rückwärts gerichteten BioY-rev-Primer (#PH4) bzw. einem in *bioN* hybridisierenden Vorwärts-Primer (#ON37) amplifiziert. Als Matrize diente das Plasmid pRcBioMNY-HMF. Die in dieser PCR gewonnenen Amplifikate fungierten in der nächsten PCR als Rückwärts- bzw. Vorwärts-Primer in Kombination mit Primer #ON37 bzw. #PH4. Durch Behandlung der PCR-Produkte und des Plasmids pRcBioMNY-HMF (*Cys-less*) mit NdeI und BglII wurden die veränderten Sequenzen in den Cys-Codon-freien Gen-Hintergrund übertragen. Um BioY-Varianten mit Einzelcysteinaustauschen zu erhalten, die ohne BioM₂N gereinigt werden konnten, wurden die bereits in *bioMNY* veränderten Genabschnitte per PCR unter Zuhilfenahme der Vorwärts- (#PH8) und Rückwärts-Primer (#PH4) für *bioY* amplifiziert. Damit wurde ans 5'-Ende des veränderten *bioY* eine NcoI-Schnittstelle und ans 3'-Ende eine BglII-Schnittstelle angefügt, über die das Konstrukt in den gleichermaßen geöffneten Vektor pRcBioY-HF im Austausch gegen das wildtypische Allel eingefügt werden konnte.

4.11.2.5 Doppelcysteinvarianten mit Cysteinaustauschen in BioN und BioY

Damit Quervernetzungsexperimente zwischen der zweiten Kopplungshelix von BioN und der ersten Membranhelix von BioY durchgeführt werden konnten, mussten *bioMNY*-Konstrukte hergestellt werden, die die einzelnen Cys-Codons in *bioN* und *bioY* vereinten. Dazu wurden die vorhergehend veränderten *bioY*-Abschnitte über XbaI und PpuMI bzw. NdeI gegen die

entsprechenden wildtypischen Abschnitte in den Konstrukten mit Cys-Codon in *bioN* ausgetauscht. Die korrekte Insertion veränderter Codons wurde mittels Restriktionsverdau überprüft, der ein Hinzukommen oder eine Eliminierung spezifischer Erkennungssequenzen als Folge des Codonaustausches anzeigte.

4.11.2.6 Aminosäureaustausche in CbiM

Zur Herstellung einer Cbi(MN)-Variante, die anstelle von Met-4 einen Cysteinrest trug, wurde das *cbi(MN)*-Konstrukt unter Nutzung des vorwärts gerichteten Mutagenese-Primers #36 und des am 3'-Ende von *cbiN* rückwärts gerichtet hybridisierenden Primers #PH24 (s. Tab. 8) amplifiziert. Für den Austausch des Cys-67 gegen Threonin oder Serin erfolgte eine Amplifikation von *cbiM* zunächst unter Nutzung der rückwärts gerichteten Mutagenese-Primer #34 bzw. #35 und dem vor dem 5'-Ende von *cbiM* auf dem Vektor hybridisierenden M13-(rev)-Primer. Die den entsprechenden Basenaustausch im Cys-Codon enthaltenden Produkte wurden in einer zweiten PCR jeweils als Primer mit dem am 3'-Ende von *cbiN* rückwärts hybridisierenden Primer #PH24 kombiniert und *cbi(MN)* als Matrize eingesetzt. Die Amplifikate wurden mit den aufwärts und abwärts des veränderten Codons schneidenden Restriktionsenzymen NsiI und EcoRI behandelt und im Austausch gegen den entsprechenden wildtypischen Abschnitt in die ebenso geöffneten Plasmide pRcCbi(MN)-S und pRcCbi(MN)QO-S eingefügt.

4.12 λ Red-vermittelte Rekombination zur Erzeugung chromosomaler Mutationen

4.12.1 Bereitstellung und Induktion der λ Red-Gene

Die für die λ Red-vermittelte Rekombination benötigten Gene *bet exo gam* wurden über das pSIM6-Plasmid bereitgestellt. Da dieses Plasmid einer temperatursensitiven Replikation unterliegt, die ab einer Temperatur von 40 °C gehemmt wird, wurde der mit pSIM6 transformierte *E. coli*-Stamm (*Δ bioH*) zunächst bei 30 °C angezogen. Zellen einer frischen Übernachtskultur in LB mit Ampicillin wurden 1:100 in 50 ml SOB-Medium mit Ampicillin in einem 250 ml-Schikanenkolben überimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 bis 0,6 unter Schütteln inkubiert. Zur Induktion der unter dem λ p_L-Promotor und dem temperatursensitiven Repressor λ c_{I857} stehenden Gene *bet exo gam* wurde die Kultur in ein Wasserbad mit 43 °C überführt und für 20 Minuten bei 220 rpm weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen

auf Eis unter Schwenken für zehn Minuten herunter gekühlt. Die hitzeinduzierten Zellen wurden in ein steriles 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für zehn Minuten bei 4500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem und sterilem destilliertem Wasser aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Nach dreimalig wiederholtem Waschen der Zellen bei 4 °C wurden die Zellen in 500 µl eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert und für die Elektroporation bereitgehalten.

4.12.2 Elektroporation und Selektion von Rekombinanten

Die für die Rekombination geeignete DNA wurde durch Amplifikation der *ΔyigM::km*-Region mit genomischer DNA des *E. coli*-Stammes JW3803-2 (*ΔyigM::km*, Keio-Kollektion) (Baba et al., 2006) als Matrize unter Nutzung der *yigM*-Vorwärts- und -Rückwärtsprimer (#FK78 und #FK83, s. Tab. 8), die 47 bp aufwärts und 29 bp abwärts des *yigM*-Lokus hybridisieren, erzeugt. Das PCR-Produkt wurde für die Elektroporation in eiskaltem reinem Ethanol gefällt, zweimal mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 40 µl sterilem destilliertem Wasser aufgenommen. 100 bis 300 ng reiner, salzfreier DNA wurden mit 50 µl elektrokompenten Zellen in einem vorgekühlten, sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß versetzt, das Gemisch sofort in eine gekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Durchmesser) überführt und bei 1,8 kV mit einer Impulsdauer von mindestens 5 ms elektroporiert (MicroPulser™, BioRad). Unmittelbar nach dem Impuls erfolgte eine Zugabe von 1 ml kaltem SOC-Medium und Überführung der Zellsuspension in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Der Transformationsansatz wurde anschließend für mindestens zwei Stunden bei 37 °C und 300 rpm inkubiert und 300 µl des inkubierten Ansatzes auf eine LB-Agarplatte mit Kanamycin ausplattiert. Kanamycinresistente Klone wurden nach etwa 48-stündiger Inkubation bei 37 °C vereinzelt und per Kolonie-PCR (vgl. Abschnitt 4.6.1) mit den Primern #FK78 und #FK80 (s. Tab. 8) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf die korrekte Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette überprüft.

4.12.3 Entfernung der Resistenzkassette durch Flp-abhängige Rekombination

Die chromosomalen Gendelektionen in den Stämmen der Keio-Kollektion (Baba et al., 2006) bestehen aus einer von zwei Flippase (Flp)-Erkennungssequenzen flankierten Kanamycin-Resistenzkassette. Durch die Flp-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae* kann die Resistenzkassette entfernt werden, zurück bleibt eine Narbenregion aus 34 Codons zwischen dem Startcodon und den letzten sechs Codons des deletierten Gens (Baba et al., 2006). Die

Ribosomenbindestelle bleibt für stromabwärts liegende Gene im Operon erhalten. *E. coli* JW3375-1 ($\Delta bioH::km$) wurde mit dem pCP20-Plasmid, welches das aus *S. cerevisiae* stammende Gen *flp* trägt, transformiert und bei 30 °C in LB-Medium mit Ampicillin angezogen. Nach Überführen in frisches LB-Medium ohne Antibiotikum im Verhältnis von 1:100 wurde die Zellsuspension zunächst bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3 bei 30 °C weiter inkubiert und anschließend in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt und dort für einige Stunden weiter geschüttelt. Die Temperaturerhöhung auf über 40 °C führt zur *flp*-Induktion durch Hitzeinaktivierung des c₁₈₅₇-Repressors bei gleichzeitigem Verlust des Replikons. Die induzierte Zellsuspension wurde schrittweise 1:10 verdünnt und je 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁻³ bis 10⁻⁶ wurden auf LB-Platten ausgestrichen. Rekombinanten wurden über den Verlust der Kanamycin- und Ampicillinresistenz identifiziert und die korrekte Größe der Narbenregion per Kolonie-PCR (Primer #FK81 und #FK82, s. Tab. 8) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft (vgl. Abschnitt 4.7).

4.13 Isolierung von Membranproteinen

4.13.1 Zellanzucht und Ernte

Die heterologe Produktion rekombinanter Proteine erfolgte in den *E. coli*-Derivaten BL21 Gold oder UT5600. Beide Stämme sind zur Überproduktion von Proteinen geeignet, da ihnen die Proteasen OmpT und Lon fehlen (s. Abschnitt 4.1). Da alle zu exprimierenden Gene auf dem pBluescript II KS(+)-Vektor (Stratagene) unter der Kontrolle des Lac-Promotors stehen, wurden die Expressionsstämme mit den für den Lac-Repressor (LacI) codierenden Hilfsplasmiden pFDX500 oder pLacI-Rare2 (s. Abschnitt 4.2) kotransformiert. Die Anzucht erfolgte im Maßstab von 500 ml bis 2 l in LB-Medium mit Ampicillin und 0,5 mM IPTG. Nach siebenständiger Inkubation bei 37 °C und 130 rpm im Schüttelinkubator wurden die Zellen in einer vorgekühlten Zentrifuge geerntet, in eiskaltem 35 mM Phosphatpuffer gewaschen und mit 6000 rpm bei 4 °C für 10 min erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.13.2 Zellaufschluss und Separation von Membranvesikeln

Folgende Puffer wurden benötigt.

35 mM Phosphatpuffer	25 mM Na ₂ HPO ₄ 11 mM KH ₂ PO ₄ pH 7
Solubilisierungspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 8 300 mM NaCl 15 % Glycerin 20 mM Imidazol
Strep-Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 8 300 mM NaCl 5% Glycerin

Gefrorene Zellpellets aus 2l-Kulturen wurden in 13 ml Phosphatpuffer unter Zugabe einer Tablette Protease-Inhibitor (PIC, cOmplete™ Mini EDTA-frei, Roche Diagnostics GmbH) und einer Spatelspitze DNase auf Eis aufgetaut und vollständig resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte eiskühlt mit zwei Durchläufen im Hochdruckaufschlussverfahren bei 18.000 Psi (HTU Digi French® Press, G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik GmbH). In einer ersten zehnminütigen Zentrifugation bei 4500 rpm und 4 °C wurden die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen entfernt. Aus dem Überstand wurde anschließend mittels Ultrazentrifugation (36.000 rpm, 4 °C, 60 bis 90 min mit Sorvall WX80, ThermoFisher) das Membranpellet vom zytosolischen Überstand separiert.

4.13.3 Solubilisierung von Membranproteinen

Die gewonnene Membran wurde nun zunächst in 5 ml Solubilisierungspuffer mit einem Glashomogenisator in kleinere Vesikel zerteilt. Nach Zugabe der gleichen Menge Solubilisierungspuffer mit 4 % (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltopyranosid (DDM, Glycon - Biochemicals GmbH) wurde der Ansatz in Eiswasser bei 250-500 rpm gerührt. In diesem Schritt erfolgte die Solubilisierung der Membranproteine, bei der diese durch das Detergenz aus der Membran herausgelöst werden. Nach zwei Stunden wurden in einer zweiten

Ultrazentrifugation (36.000 rpm, 4 °C, 50 min) nicht gelöste Membranbestandteile abgetrennt und der Überstand (Solubilisat) zur weiteren Proteinreinigung bereitgehalten.

4.13.4 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Folgende Puffer wurden verwendet.

Solubilisierungspuffer	s. Abschnitt 4.13.2
Grundpuffer I	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 300 mM NaCl 15 % Glycerin
Grundpuffer II	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 300 mM NaCl 15 % Glycerin 300 mM Imidazol
Strep-Puffer	s. Abschnitt 4.13

4.13.5 Reinigung über Ni-NTA-Agarose

Um Proteine gezielt von unspezifischen Proteinen zu trennen, trugen alle rekombinanten Proteine Affinitätsmarker (*Tags*). Für die Reinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden die Proteine N-terminal mit einem Deka-Histidin-*Tag* fusioniert. Dem Prinzip liegt die spezifische Komplexierung zweiwertiger Metallionen wie Ni^{2+} oder Co^{2+} durch die Imidazolringe zweier Histidine zugrunde, wobei die Metallionen selbst über einen Chelatkomplex mit Nitrilotriessigsäure an der Agarosematrix immobilisiert sind. Das Solubilisat aus einer 2l-Zellsuspension wurde dazu über Nacht mit 1 ml Ni-NTA-Agarosematrix (Quiagen) bei 4 °C unter schwenken inkubiert. Die Protein-beladene Matrix wurde daraufhin in einem 5 ml-Säulchen mit 50 ml Waschpuffer I (Solubilisierungspuffer mit 0,05 % (w/v) DDM und 5 mM DTT) und anschließend 100 ml Waschpuffer II (Grundpuffer mit 100 mM Imidazol, 0,05 % (w/v) DDM und 5 mM DTT) gewaschen. Durch den Anstieg der Imidazolkonzentration wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution erfolgte mit bis zu 3,5 ml Elutionspuffer (Grundpuffer II mit 0,05 % (w/v) DDM und 2 mM DTT) in 0,5 ml-Schritten. Die vereinten Eluate wurden etwa 1,5-fach ankonzentriert (s.

Abschnitt 4.16) und zur Entfernung des Imidazols in Grundpuffer I mit 0,05 % (w/v) DDM und 2 mM DTT umgepuffert (s. Abschnitt 4.14).

4.13.6 Reinigung über Strep-Tactin Superflow

Dieses affinitätschromatographische Verfahren beruht auf der Bindung von Streptavidin und Biotin, die zu den stärksten in der Natur vorkommenden nicht-kovalenten Bindungen zählt. Das Strep-Tag besitzt die Aminosäuresequenz WSHPPQPGK und bindet mit sehr hoher Affinität an Strep-Tactin (Qiagen), ein künstliches und optimiertes Streptavidin, das an einer Agarose-Matrix immobilisiert ist. Zur Reinigung Strep-markierter Proteine wurden die per Ultrazentrifugation (vgl. Abschnitt 4.13.2) separierten Membranen aus 2l-Zellkultur zunächst in Strep-Puffer (s. Abschnitt 4.13.2 mit 2 % (w/v) DDM solubilisiert, Abschnitt 4.13.3). Das nach der zweiten Ultrazentrifugation gewonnene Solubilisat wurde über Nacht bei 4 °C mit 1 ml äquilibrierter Strep-Tactin-Matrix schwenkend inkubiert. Nicht oder nur unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 75 ml Strep-Puffer mit 0,05 % (w/v) DDM entfernt und die Strep-markierten Proteine anschließend in 5 ml Strep-Puffer mit 5 mM Desthiobiotin in 250 µl-Schritten eluiert. Desthiobiotin ist ein Analogon des natürlichen Streptavidin-Liganden Biotin und verdrängt das Strep-Tag aufgrund seiner noch höheren Affinität aus der Bindung.

4.14 Umpuffern von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mithilfe von PD10- bzw. G-25-Entsalzungssäulen (GE Healthcare) in Grundpuffer I (s. Abschnitt 4.13) mit 0,05 % (w/v) DDM umgepuffert. Bei dieser Form der Größenausschluss-Chromatographie werden kleinere Moleküle zurückgehalten, sodass Proteine unter Abscheidung von Salzen aus der Säule eluiert werden. Die Säulen wurden dazu vorher mit oben genanntem Puffer äquilibriert. Die Anwendung erfolgte entsprechend Protokoll nach dem Gravitationsprinzip.

4.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

4.15.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit kationischen und ungeladenen Aminosäureseitenketten.

Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs auf 595 nm verschoben. Der Nachweis ist damit proteinspezifisch und müsste zur exakten Proteinbestimmung kalibriert werden. Hier wurde der Test nur zur qualitativen Abschätzung der Proteinkonzentration während der Proteinreinigung genutzt. Dazu wurden 200 µl Bradford-Reagenz (0,007 % [w/v] Servablue G-250 in 8,5 %iger [v/v] Phosphorsäure mit 5 % [v/v] Ethanol, dunkel gelagert) mit 5 µl Proteinprobe gemischt und die Intensität der Blaufärbung optisch abgeschätzt.

4.15.2 Proteinbestimmung mit BCA (Bicinchoninsäure)

Der Proteinnachweis beruht auf der Komplexbildung je zweier Bicinchoninsäuremoleküle mit einwertigen Kupferionen, welche zuvor von Proteinen quantitativ reduziert werden. Der violette Kupfer-Bicinchoninsäure-Komplex ist photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm detektierbar. Die Bildung des Farbkomplexes wird jedoch von den Seitenketten der Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan beeinflusst, weshalb die Reaktion in gewissem Maße von der Sequenz abhängt. Verwendet wurde das Pierce® BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific), die Kalibrierung erfolgte laut Herstellerangabe mit BSA. 25 µl Probe wurden in einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Arbeitslösung gemischt, für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Absorption im Plattenlesegerät (Spectramax M, Molecular Devices) gemessen.

4.15.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Detergenzsolubilisierter Membranproteine wurden mithilfe des Lowry Total Protein Kits von Sigma nach einem durch Peterson modifizierten Lowry-Protokoll quantifiziert. Diese Methode eignet sich für Membranproteine, da der Biuret-Reaktion und Farbkomplexbildung eine Proteinfällung durch Desoxycholat und Trichloressigsäure vorausgeht und damit eventuell störende Effekte des Detergenz minimiert werden. Proteine wurden 1:20 bis 1:40 in 1 ml H₂O_{dd} verdünnt und mit 100 µl Desoxycholat und 100 µl Trichloressigsäure gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Proteinpellet in 1 ml Lowryreagenz mit 1 ml H₂O_{dd} resuspendiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Folin & Ciocalteu'schem Reagenz und weiteren 30 min Inkubation wurde die Absorption bei 750 nm gemessen. Eine Kalibrierung erfolgte mit Rinderserumalbumin (BSA).

4.15.4 Proteinbestimmung mittels Infrarot-Spektrometer

Die Eigenschaft von Peptidbindungen, elektromagnetische Strahlung im Infrarot-Bereich zu absorbieren, ermöglicht eine einheitliche Proteinbestimmung gänzlich unabhängig von Aminosäureseitenketten. Verwendet wurde das Infrarot-Spektrometer Direct Detect® (Merck Millipore). Da bei 20 mM Tris und 5 % (v/v) Glycerin bereits Hintergrundabsorptionen auftreten, war die Proteinbestimmung mittels IR-Spektrometer nur bei solchen Anwendungen möglich, in denen die Konzentrationen dieser Pufferbestandteile entsprechen niedrig gehalten werden konnten. 1 µl Proteinlösung wurde auf die Messmembran pipettiert und bis zur Messung vollständig getrocknet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über eine interne BSA-Kalibrierung.

4.16 Konzentrationserhöhung von Proteinen

Proteine wurden mithilfe von Amicon® Ultra-Zentrifugalröhrchen (0,5 ml oder 15 ml, Merck Millipore) ankonzentriert. Für detergenzsolubilisierter BioM₂NY-Komplexe wurde eine Ausschlussgröße von 100 kDa und für solitäre BioY-Proteine von 30 kDa gewählt.

4.17 Größenausschluss-Chromatographie (SEC) mithilfe eines ÄKTA-Systems

Bei der Größenausschluss-Chromatographie oder Gelfiltration werden Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Retentionszeit einer Substanz steigt mit abnehmendem Molekulargewicht. Verwendet wurden die Säulen Superdex 200 10/300 GL und Superdex 200 Increase 10/300 GL (Amersham Bioscience) in den Chromatographie-Anlagen ÄKTA Purifier 10 oder ÄKTA Pure 25 L (GE Healthcare). Nach Spülen der Säule mit destilliertem Wasser und Äquilibration mit zwei Bettvolumen Grundpuffer I (mit 0,05 % [w/v] DDM und 2 mM DTT) wurden 500 µl der Proteinprobe aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,2 bis 0,3 ml/min, Eluate wurden in Fraktionen von 200 bis 500 µl gesammelt. Im unmittelbaren Anschluss an den Lauf wurde die Säule entweder für eine weitere Auftrennung verwendet oder mit Wasser und weiterhin 20 % (v/v) Ethanol gespült. Die Proteine in den gesammelten Fraktionen wurden auf etwa 1 mg/ml konzentriert (s. Abschnitt 4.16) und für weitere Experimente bereitgehalten oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.18 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Folgende Puffer und Gele wurden verwendet.

Probenpuffer, 6fach	300 mM Tris/HCl, pH 6,8 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,012 % (w/v) Bromphenolblau 36 % (v/v) Glycerin 12 % (w/v) SDS
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS (Roth, für Elektrophorese)
Sammelgel	125 mM Tris/HCl, pH 6,8 4 % (w/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) 0,01 % (v/v) Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Trenngel	375 mM Tris/HCl, pH 8,8 14 % (w/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) 0,01 % (v/v) Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Coomassie-Färbelösung	42,5 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 5 % (v/v) Methanol 0,2 % (w/v) Coomassie BrilliantBlue R250 0,05% (w/v) Coomassie BrilliantBlue G250
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 10 % (v/v) 2-Propanol

In der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer molekularen Größe in einer porösen Polyacrylamid-Matrix aufgetrennt. Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und überdeckt zugleich deren Eigenladungen. Da die SDS-Protein-Komplexe ein annähernd konstantes Ladung-zu-Masse-Verhältnis aufweisen, ist der Stokes-

Radius proportional zur Ladung. Größere Proteine laufen daher langsamer durch die Matrix als kleinere. Verwendet wurde ein modifiziertes diskontinuierliches Lämmli-System (Laemmli, 1970) mit Tris-Glycin-Puffer, bei dem die Proteine erst in einem pH-neutralen, niedrigprozentigen Sammelgel auf gleiche Laufhöhe gebracht und anschließend in einem Trenngel mit höherem pH getrennt werden. Dabei kamen 14 %ige (w/v) selbstgegossene Gele oder Gradientengele der Firma BioRad (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, 4-20% [w/v] Acrylamid) in Vertikalkammern zum Einsatz. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 140 V für 65 min. Pro Probestasche wurden etwa 3 µg Protein eingesetzt, als Standard diente der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard von BioRad. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die SDS-Gele für den Western-Blot (s. Abschnitt 4.19) verwendet oder mit Coomassie gefärbt. Die Färbung erfolgte für 30 Minuten, die Entfärbung in zwei Waschschritten bis zur vollständigen Entfärbung des Gels. Die Digitalisierung erfolgte mithilfe einer CCD-Kamera (ImageQuant LAS 400, GE Healthcare) mit einer Auflösung von mindestens 300 dpi.

4.19 Western-Blot und Immundetektion von Proteinen mit Affinitätsmarker

Beim Western-Blot werden die SDS-Protein-Komplexe elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, auf der ein immunologischer Nachweis mit anschließender Farbreaktion erfolgt. Die Farbreaktion wird durch eine an die Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase (AP) katalysiert.

Es wurden die folgenden Puffer und Lösungen verwendet.

Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin
TBS	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-T	TBS mit 0,05 % (v/w) Tween 20
Entwicklungspuffer	0,1 M Tris/HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl 0,01 M MgCl ₂

4.19.1 Semi-Dry Blot

Die Nitrocellulose-Membran (PALL Life Sciences, BioTrace™ NT *Pure Nitrocellulose Blotting Membrane*) und das Whatman-Papier (3 mm, Whatman™) wurden vor dem Blotten für 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Zwei Lagen Whatman-Papier, die Membran, darauf das SDS-Gel sowie zwei weitere Papierschichten wurden luftblasenfrei zwischen die Anoden- und die Kathodenplatte der Blot-Aparatur (*Semi-Dry* Transferzelle, Bio-Rad) gestapelt. Der Transfer auf die Membran erfolgte unter konstanter Spannung von 20 Volt für 20 Minuten.

4.19.2 Blockieren der Nitrocellulose-Membran

Um während der immunologischen Nachweisreaktion eine unspezifische Antikörperbindung an die Membran zu verhindern, wurden unbelegte Bindestellen mit Magermilchpulver geblockt. Dazu wurde die Membran nach dem Blotten entweder für eine Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C unter Schwenken in TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert.

4.19.3 Immundetektion der Proteine

4.19.3.1 Detektion des Deka-Histidin-Tags

Der Nachweis Deka-Histidin-markierter Proteine erfolgte mithilfe eines monoklonalen Anti-Polyhistidin-Antikörper-AP-Konjugats murinen Ursprungs (Sigma Aldrich). Das Antikörper-Konjugat wurde 1:2000 in TBS mit 1 % (w/v) BSA verdünnt und für zwei Stunden mit der Membran inkubiert. Vor und nach der Antikörper-Inkubation wurde die Membran jeweils dreimal 10 Minuten mit TBS-T und dreimal 5 Minuten mit TBS gewaschen.

4.19.3.2 Detektion des cMyc-Tags

Der Nachweis von cMyc-*Tag*-markierten Proteinen erfolgte über ein monoklonales Anti-cMyc-Antikörper-AP-Konjugat murinen Ursprungs (Sigma Aldrich). Das Konjugat wurde 1:1000 in TBS-T verdünnt und für zwei Stunden mit der Membran inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde jeweils dreimal 10 Minuten mit TBS-T und dreimal 5 Minuten mit TBS gewaschen.

4.19.3.3 Detektion des FLAG-Epitops

FLAG-markierte Proteine wurden mithilfe eines monoklonalen Anti-FLAG®-M2-Antikörper-AP-Konjugats murinen Ursprungs (Sigma Aldrich) detektiert. Das Konjugat wurde 1:1000 in TBS-T verdünnt und für zwei Stunden mit der Membran inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde jeweils dreimal 10 Minuten mit TBS-T und dreimal 5 Minuten mit TBS gewaschen.

4.19.4 Farbreaktion

Der Farbnachweis erfolgte schließlich mithilfe einer an die Antikörper konjugierten Alkalischen Phosphatase (AP), die eine Umsetzung der Substrate 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) zu farbigen Produkten katalysiert. Dabei entsteht aus BCIP unter Phosphatabspaltung ein Indoxyl-Derivat, welches durch Sauerstoff weiter zum Indigofarbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo oxidiert wird. Diese Oxidation wird durch NBT unterstützt, welches dabei selbst zu einem rot-blauen Formazanindigo reduziert wird. Die Membran wurde mit Entwicklungspuffer mit 1:1000 BCIP (50 mg/ml in DMF) und 1:1000 NBT (100 mg/ml in 70 % [v/v] DMF) für wenige Sekunden bis Minuten bis zum Eintreten einer sichtbaren Farbreaktion inkubiert und anschließend mit Wasser gespült. Die Digitalisierung erfolgte mithilfe einer CCD-Kamera (ImageQuant LAS 400, GE Healthcare) mit mindestens 300 dpi.

4.20 Rekonstitution isolierter BioM₂NY-Komplexe in Nanodiscs

Nanodisc-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,4
	100 mM NaCl

Nanodiscs sind Protein-Lipid-Partikel, bestehend aus einer scheibchenförmigen Phospholipid-Doppelschicht mit einem darin rekonstituierten Membranprotein, welche durch zwei amphipathische Gürtelproteine (MSP, *Membrane Scaffold Protein*) zusammengehalten werden (Bayburt und Sligar, 2010). Die Gürtelproteine sind Derivate des humanen Apolipoproteins ApoA1, dem Proteinbestandteil des Cholesterin bindenden *high density lipoprotein* (HDL)-Komplexes. Diese können rekombinant durch Trunkierung oder Hinzufügen weiterer amphipathischer Helices in ihrer Länge variiert werden und damit Nanodiscs verschiedener Durchmesser bilden. Verwendet wurde MSP1E3D1 (Grinkova et al., 2010), welches

freundlicherweise für die gesamten Arbeiten von Heidi Landmesser (AG Prof. Dr. Erwin Schneider) zu Verfügung gestellt wurde.

Zur Herstellung von Nanodiscs wurden 8,3 mg Lipid (*E. coli total lipid extract*, gelöst in Chloroform, Avanti) im Rotationsverdampfer getrocknet und in 900 µl Nanodisc-Puffer mit 87 µl DDM-Lösung (10 % [w/v] in Nanodisc-Puffer) im Ultraschallbad für 5 min gelöst. Dem Ansatz wurden 0,96 mg solubilisiertes BioM₂NY und 1,62 mg Gürtelprotein zugefügt, das Gemisch mit Stickstoffgas überschichtet und für eine Stunde bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Das Gemisch aus Biotintransporter, Gürtelprotein und Lipid entsprach einem molaren Verhältnis von 1:5:1200. Für die Assemblierung der Nanodiscs wurden dem Ansatz nun 1,5 g Bio-BeadsTM SM-2 (Bio-Rad) hinzugefügt und dieser für vier Stunden bei 4 °C unter Schwenken weiter inkubiert. Durch die hydrophobe Oberfläche der Polystyrol-Bio BeadsTM wird dem Proteinkomplex und dem gelösten Lipid Detergenz entzogen, was über hydrophobe Wechselwirkungen in wässriger Umgebung die Zusammenlagerung der Lipide, Membranproteine und Gürtelproteine zu Nanodiscs begünstigt. Nach Absetzen der Bio-BeadsTM wurde der Überstand entnommen und über Nacht mit Ni-NTA-Matrix (Quiagen), die zuvor mit dem gleichen Puffer äquilibriert wurde, inkubiert, um über den His-Tag an BioM die BioM₂NY enthaltenden von leeren Nanodiscs zu trennen. So wurden nach Waschen mit 5 ml Nanodisc-Puffer und 8 ml Nanodisc-Puffer mit 25 mM Imidazol die fertigen Nanodiscs mit 250 mM Imidazol eluiert. Das Gesamteluat betrug 2,5 ml und wurde anschließend in 0,5 ml -Konzentratoren (Amicon® Ultra, 100 kDa Ausschlussgröße, Merck-Millipore) auf etwa 250 µl konzentriert, durch zweimaliges Konzentrieren und Verdünnen mit Nanodisc-Puffer vom Imidazol befreit und zur weiteren Verwendung bei 4 °C bereitgehalten. Die Konzentrationsbestimmung rekonstituierter Proteine erfolgte mittels Pixelanalyse (GELSCAN 5) der mit Coomassie gefärbten Proteine im SDS-Gel. Zur Kalibrierung wurden definierte Mengen des gleichen Proteins mit bekannter Konzentration eingesetzt.

4.21 Messung der ATPase-Aktivität nach Ames

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von ECF-Transporter-Komplexen wurde ein nach Ames (Ames et al., 2001) modifiziertes Protokoll eingesetzt.

4.21.1 Enzymreaktion

In DDM solubilisierter oder in Nanodiscs rekonstituierte Proteine wurden auf 10 µg Protein in 120 µl Puffer eingestellt und für 3 bis 5 min mit 2 mM ATP (2,5 µl einer 100 mM Lösung) bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 3 mM MgCl₂ (0,75 µl einer 500 mM Lösung). Nach 1, 2, 3 und 4 oder 2, 4, 6, und 8 min wurden 25 µl des Ansatzes abgenommen und die Reaktion in 25 µl 12 %iger (w/v) SDS-Lösung, die in die Vertiefungen einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte vorgelegt worden waren, durch Denaturierung der Proteine gestoppt. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurde eine Messung ohne MgCl₂ durchgeführt. Wurde der Einfluss von Biotin auf die ATP-Hydrolyse untersucht, erfolgte die Biotinzugabe nach Vorinkubation mit ATP. AMP-PNP und Natrium-orthovanadat (beides von Sigma-Aldrich) wurden freundlicherweise als Arbeitslösungen (0,1 M) von Heidi Landmesser aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Schneider zur Verfügung gestellt.

4.21.2 Nachweis von anorganischem Phosphat

Der quantitative Nachweis des durch ATP-Hydrolyse freigesetzten anorganischen Phosphats erfolgte spektrometrisch mithilfe einer Farbreaktion, die mit seriellen Verdünnungsstufen einer 1 mM Na₂HPO₄-Lösung kalibriert wurde. Der Nachweis beruht auf der Umsetzung von freiem Phosphat mit Molybdän zu Phosphomolybdat, welches bei niedrigem pH-Wert einen blauen Farbkomplex bildet (Chifflet et al., 1988). Die Farbreaktion wird durch Zugabe von Arsenit im Überschuss durch Bildung eines farblosen Arsenomolybdat-Komplexes gestoppt. Zu den nach verschiedenen Zeitpunkten in SDS denaturierten Proteinansätzen wurden 50 µl eines Äquivolumen-Gemisches von Lösung A (150 mg Ascorbinsäure in 2,5 ml 1 N HCl) und Lösung B (1 % [w/v] Ammoniummolybdat) gegeben. Lösung A muss immer frisch angesetzt werden. Die Bildung des Farbkomplexes wurde nach 5 min durch Zugabe von 75 µl Lösung C (2 % [v/v] Essigsäure, 2 % [w/v] Natriumarsenit, 2 % [w/v] Natriumcitrat) gestoppt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 750 nm im Mikroplatten-Lesegerät (SpectraMax M2, Molecular Devices, MTX Lab Systems) gemessen.

4.22 Chemische Quervernetzung von Thiolgruppen

4.22.1 Quervernetzung von BioM₂NY durch Kupferphenantrolin in isolierten Membranen

400 ml einer 7 h in LB-Medium mit Ampicillin und 0,5 mM IPTG gewachsenen Kultur von *E. coli* UT5600-Zellen, die das pFDX500- und das entsprechende Expressionsplasmid trugen, wurden abzentrifugiert, in 35 mM Phosphatpuffer resuspendiert und mittels French-Press (s. Abschnitt 4.13.2) aufgeschlossen. Die per Ultrazentrifugation isolierten Membranen wurde in 2 ml Solubilisierungspuffer homogenisiert, der Gesamtproteingehalt mittels BCA-Proteinbestimmung quantifiziert und auf 3 mg/ml eingestellt. Die quervernetzende Oxidation der Thiolgruppen erfolgte mithilfe katalysierender Kupferphenantrolin (Cu-Phe)-Komplexe (Kobashi, 1968). 120 µl der Membranlösung wurden mit 48 µl Puffer und 48 µl Cu-Phe (15 mM CuSO₄, 45 mM 1,10-Phenantrolin) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 24 µl 50 mM N-Ethylmaleimid (NEM) gestoppt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde der Ansatz halbiert und mit je 25 µl 6fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (300 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,012 % [w/v] Bromphenolblau, 36 % [v/v] Glycerin, 12 % [w/v] SDS) ohne bzw. mit 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol gemischt. Parallel wurden 80 µl des unbehandelten Proteinansatzes mit 30 µl Puffer, 10 µl NEM mit 25 µl SDS-Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol gemischt. Je 15 µl der unbehandelten und behandelten Proben wurden in unterschiedlichen Gelen per SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot gegen die cMyc- und FLAG-Epitope auf heterodimere Vernetzungsprodukte aus BioN und BioY analysiert.

4.22.2 Längenspezifische Quervernetzung isolierter BioM₂NY-Komplexe

Zur Vernetzung der BioM-Untereinheiten von BioM₂NY-Komplexen in Nanodiscs oder von BioNY-Heterodimeren detergenzsolubilisierter Komplexe durch die längenspezifischen Linkermoleküle 1,2-Ethandiyl-Bis-Methanthiosulfonat (EBS, 5 Å), 1,6-Hexandiyl-Bis-Methanthiosulfonat (HBS, 10 Å) und 3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecan-1,17-diyl-Bis-Methanthiosulfonat (PBS, 25 Å) wurden Proben (500 µg/ml) zunächst mit 2 mM DTT unter Luft- (bei Proteinen in Nanodiscs) bzw. Stickstoffatmosphäre (bei detergenzsolubilisierten Proteinen) reduziert. Anschließend wurden die Proben gesplittet, eine Hälfte mit 2 bis 5 mM ATP versetzt und für 20 min mit 4 mM EBS, HBS oder PBS (Toronto Research Chemicals) inkubiert. Durch Zugabe von 5 mM NEM wurde die Reaktion gestoppt. Die Vernetzung der

Proben in Detergenzlösung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre, um intrinsische Vernetzungsprodukte zu minimieren. Zur Analyse der Produkte wurden die Proben ohne 2-Mercaptoethanol per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt.

4.23 Fluoreszenzspektroskopie

Fällt ein Elektron aus einem elektronisch angeregten Zustand (S_1) in seinen Grundzustand (S_0) zurück und emittiert dabei ein Photon, wird von Fluoreszenz gesprochen. Die vorausgehende Anregung erfolgt meist durch Absorption von Licht innerhalb von Picosekunden (10^{-12} s), dabei wird das Elektron ohne Spin-Umkehr aus einem bindenden in ein nicht bindendes Orbital gehoben. Da sich mit der Anregung die Elektronendichte im System ändert und damit die Wellenfunktionen des elektronisch angeregten Zustandes und des elektronischen Grundzustandes überlappen, erfolgt die Anregung mit hoher Wahrscheinlichkeit in einen höheren Schwingungszustand (Franck-Condon-Prinzip). Durch strahlungslose Relaxation kehrt das Elektron in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes zurück, von dem aus unter Photonenemission (Fluoreszenz) die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand erfolgt. Aufgrund dieser als Kasha-Regel bezeichneten Gesetzmäßigkeit ist das Emissionslicht immer energetisch ärmer als das Anregungslicht und damit rotverschoben (*Stokes-Shift*). Während der Anregung ändert sich jedoch auch das Dipolmoment des Fluorophors, welches im Grundzustand mit den Lösungsmittelmolekülen im Gleichgewicht stand. Um dieses Gleichgewicht wiederherzustellen, orientieren sich die Moleküle um. Dieser als Solvenzrelaxation bezeichnete Prozess ist verglichen mit der Anregung langsam (10^{-10} s), jedoch schneller als die Rückkehr des Elektrons aus dem elektronisch angeregten in den Grundzustand (Fluoreszenzlebensdauer, 10^{-9} s). Dies führt zu einer Absenkung des S_1 -Energieniveaus und damit einer noch stärkeren Rotverschiebung des Emissionsmaximums zum Anregungsmaximum. Einen starken Einfluss haben hier kleine polare Lösungsmittelmoleküle mit hohem Dipolmoment wie Wasser. Der umgebungssensitive Fluoreszenzmarker 2-(4'-Maleimidylanilino)-Naphthalen-6-Sulfonsäure (MIANS, Life Technologies) zeigt daher eine Rotverschiebung (bathochrom) seines Emissionsmaximums beim Übergang in eine polarere und eine Blauverschiebung (hypsochrom) beim Übergang in eine hydrophobere Umgebung. Werden Proteine ortsspezifisch über Thiolgruppen mit MIANS gekoppelt, kann die Analyse der Emissionsspektren Aufschluss über eine Änderung der Polarität der lokalen Proteinumgebung und damit Informationen über die Proteindynamik liefern (Wan et al., 2009).

4.23.1 Fluoreszenzmarkierung von Thiolgruppen mit MIA NS

MIA NS ist über seine Maleimid-Kopplungsgruppe thiolreaktiv und kann spezifisch an Cystein-Seitenketten gebunden werden. Zu markierende Proteine oder Proteinkomplexe wurden in Detergenzlösung oder in Nanodiscs in 500 µl-Ansätzen bei einer Konzentration von 2 µM mit 20 µM MIA NS für 2 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Ungebundenes Label wurde anschließend per Gelfiltration mithilfe von G-25-Entsalzungssäulen (GE Healthcare) in Grundpuffer I mit 0,05 % (w/v) DDM (s. Abschnitt 4.13.4) oder Nanodisc-Puffer (s. Abschnitt 4.20) entfernt.

4.23.2 Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden im Fluoromax-4 Spectrofluorometer (HORIBA Jobin Yvon) zwischen 380 und 480 nm bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in 100 µl-Volumina mit 2 µM Protein in Detergenzlösung oder in Nanodiscs ohne bzw. mit 2 mM ATP oder 2 mM ATP und 20 µM Biotin. Referenzspektren in wässriger Lösung wurden mit 2,5 µM ungebundenem Fluorophor und 10 µM DTT im entsprechenden Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Emissionsmaxima wurden die Spektren mithilfe der Software PeakFit (Version 4.12, SeaSolve Software) einer Gauß'schen Dekonvolution unterzogen.

4.24 Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie

4.24.1 Grundlagen der ESR-Spektroskopie

Elektronen besitzen ein magnetisches Moment, das durch den Bahndrehimpuls der Teilchen und ihren Eigendrehimpuls, den sogenannten Elektronenspin, gegeben ist. Die Magnetquantenzahl des Elektronenspins m_s kann die Werte $+1/2$ oder $-1/2$ annehmen. In einem von außen angelegten Magnetfeld (B_0) kann der Spin eines freien, ungepaarten Elektrons daher zwei diskrete Orientierungen (parallel oder anti-parallel) einnehmen, die durch den Energieterm

$$E = m_s \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot B_0$$

beschrieben werden. Dabei ist g der Landé- oder Korrekturfaktor, der für ein freies Elektron $g_e=2,002319315$ beträgt, und μ_B das Bohr'sche Magneton. Diese als Zeeman-Effekt

bezeichnete Aufspaltung der Spinzustände (Abb. 34) im äußeren Magnetfeld führt in einer Substanz mit ungepaarten Elektronen zum makroskopischen Phänomen des Paramagnetismus. Bei der ESR-Spektroskopie wird diese Eigenschaft genutzt und durch Einbringen eines elektromagnetischen Wechselfeldes in Form von Mikrowellenstrahlung ein Übergang aus der energetisch favourisierten (parallel) in die energetisch nicht favourisierte (anti-parallele) Spin-Orientierung angeregt. Sofern die eingestrahlte Energie der Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen mit $\Delta m_s=1$ entspricht (Resonanz), ist ein Absorptionssignal messbar. Die Resonanzfrequenz (ν) und das Absorptionsspektrum sind von der Umgebung des Spins abhängig.

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{g_e \cdot \mu_B \cdot B_0}{h}$$

Durch gezielte Markierung von Cysteinseitenketten mit dem thiolreaktiven Methanthiosulfonat (MTS)-Nitroxid-Spinlabel können Proteine, die selbst nicht ESR-sensitiv sind, mit einer Sonde versehen werden, die Informationen zur Struktur und Dynamik der umliegenden Regionen liefert. ESR-Spektren werden jedoch nicht nur von der Polarität, sterischen Interaktionen oder Viskosität der Umgebung, sondern auch von benachbarten Spins beeinflusst. So führt die Interaktion mit naheliegenden Kernspins beispielsweise zu einer energetischen Feinaufspaltung, die sich in der Komplexität des Absorptionsspektrums niederschlägt. Das lokale Magnetfeld eines Spins wird auch durch benachbarte Elektronenspins verstärkt oder geschwächt, wodurch eine Änderung des Absorptionsspektrums messbar wird, die Aussagen über Spin-Spin-Abstände ermöglicht. Durch Spinmarkierung zweier Cysteinreste in Proteinen oder Protein-Komplexen sind daher Abstandsmessungen möglich, die Informationen über Struktur und Dynamik liefern können (Klare und Steinhoff, 2009). Da es sich bei dieser Interaktion um eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung handelt, nimmt der Einfluss benachbarter Spins mit der dritten Potenz des Abstands ab und Spin-Spin-Interaktionen sind deshalb nur bis zu einer Distanz von maximal 8 nm messbar (Misra und Freed, 2011).

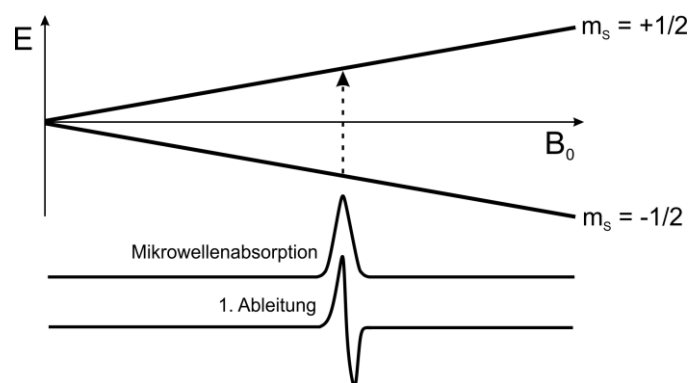


Abb. 34: Zeeman-Effekt. Im externen Magnetfeld (B_0) können Elektronenspins zwei Orientierungen einnehmen. Entspricht die eingestrahlte Mikrowellenenergie ($h\nu$) der Energiedifferenz (ΔE) zwischen den Spinzuständen, kommt es zur Absorption. Das ESR-Signal wird zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses per phasensensitiver Detektion bestimmt und entspricht daher der 1. Ableitung der Mikrowellenabsorption.

4.24.2 Spinmarkierung von Proteinen mit MTSSL

Spinmarkierung von BioM₂NY-Komplexen, die Doppelcysteinaustausche enthielten, erfolgte nach Einbau der Komplexe in Nanodiscs (s. Abschnitt 4.20) mit dem thiolreaktiven Methanthiosulfonat-Nitroxid-Spinlabel (MTSSL, Enzo Life Sciences GmbH). Die Herstellung der BioM₂NY-enthaltenden Nanodiscs fand zunächst unter Anwesenheit von 1 mM DTT statt, um die Ausbildung von Disulfiden zu minimieren. Nach Entfernen des Reduktionmittels über eine Entsalzungssäule (Zeba Spin von Pierce oder G-25 Minitrapp von GE Healthcare) wurden 500 μ l der Probe mit MTSSL in 20fachem Überschuss (bezogen auf die Thiolgruppen, dies entsprach 0,2 - 0,5 μ l einer 100 mM Stammlösung in DMSO) über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Nicht gebundenes Label wurde über eine Entsalzungssäule entfernt, die Probe auf ein Volumen von etwa 300 μ l konzentriert und mit Glycerin (10 % [v/v] Endkonzentration) versetzt. Die spinmarkierten Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Trockeneis versandt.

4.24.3 Continuous-Wave (cw)-ESR-Spektroskopie

Bei der cw-ESR wird die Resonanz durch eine kontinuierliche Mikrowellenstrahlung mit konstanter Frequenz in einem veränderlichen Magnetfeld erzeugt, sodass das Absorptionsspektrum als Funktion der magnetischen Feldstärke aufgenommen wird. Das Signal wird üblicherweise in der ersten Ableitung dargestellt. Kobaltspektren wurden durch M. Sippach (AG Makromolekülstruktur/Experimentalphysik von Prof. Dr. H.-J. Steinhoff, Uni Osnabrück) aufgenommen. Die Messungen erfolgten an einem ESR-Spektrometer

(Eigenkonstruktion) mit einer Bruker High-Q-Kavität und einem Bruker B-NM 12 B-Feld-Meter bei X-Band (9,3-9,4 GHz). Die Mikrowellenleistung betrug 10 mW für die Messung von CoSO_4 und 0,007 mW für alle anderen Proben. Die Temperierung von 10 K wurde durch einen Helium-Durchfluss-Kryostat von Oxford Instruments (ESR 900) erreicht.

4.24.4 Gepulste ESR-Spektroskopie (DEER)

Spin-Spin-Abstände zwischen etwa 0,5 und 2 nm lassen sich mit cw-ESR-Spektroskopie bei Tieftemperatur bestimmen. Bei größeren Abständen sind die dann relativ schwächeren Spin-Spin-Interaktionen von anderen Umgebungseinflüssen per cw-ESR nicht mehr unterscheidbar. Durch das gepulste ESR-Verfahren DEER (*double electron-electron resonance*) kann der Einfluss anderer Wechselwirkungen allerdings gezielt minimiert werden, sodass Spin-Spin-Interaktionen bis zu 6 nm, in günstigen Fällen sogar bis zu 8 nm auflösbar sind (Jeschke, 2012). Beim DEER-Verfahren wird die Probe einem konstanten Magnetfeld (B_0 entlang der z -Achse) ausgesetzt und die beiden interagierenden Spin-Populationen werden über unterschiedliche Mikrowellenfrequenzen (ω_A , *observer* und ω_B , *pump*) separat im Abstand von Nanosekunden angeregt. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten Vier-Puls-Sequenz (Abb. 35) werden die *observer*-Spins zunächst mit dem Puls $\pi/2$ in die xy -Ebene orientiert und nach der Zeit τ_1 mit dem Puls π entlang der y -Achse um 180° gedreht. Dadurch werden Spins, die mit unterschiedlicher Geschwindigkeit relaxieren, nach $2\tau_1$ fokussiert. Über einen Puls mit der *pump*-Frequenz (ω_B) werden nun die Spins der zweiten Population angeregt, wodurch per Spin-Spin-Kopplung die Resonanzfrequenz der *observer*-Spins beeinflusst wird. Durch Ansetzen zeitverschobener *pump*-Pulse folgt das *observer*-Echo einem exponentiellen Abfall, der mit einer Oszillation überlagert ist, die die Information des Abstands trägt.

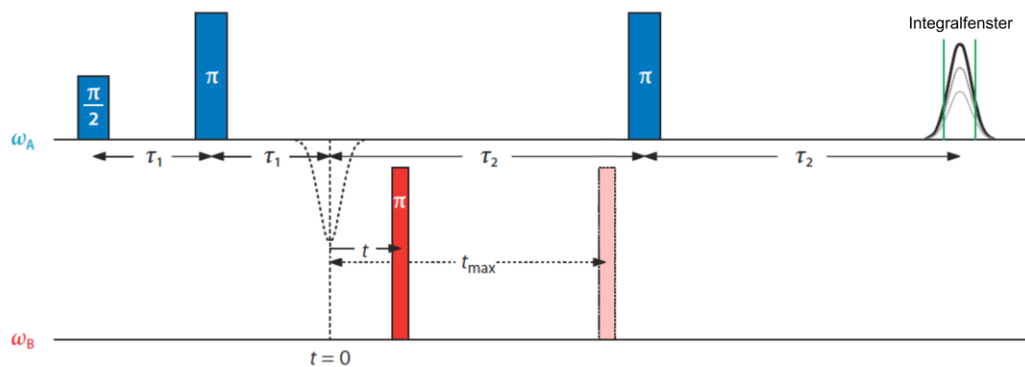


Abb. 35: Schema der Vier-Puls-Sequenz. Das Integral $V(t)$ des *observer*-Echos ergibt das DEER-Signal. Abbildung modifiziert nach Jeschke (2012).

DEER-Experimente wurden durch M. Sippach (AG Makromolekülstruktur/Biophysik von Prof. Dr. H.-J. Steinhoff an der Uni Osnabrück) mit X-Band-Mikrowellen (9,3-9,4 GHz) an einem Bruker Eleksys 580 ESR-Spektrometer durchgeführt, das mit einem Bruker Flexline *Split-Ring* Resonator ER 4118X-MS3 ausgestattet war. Die Temperierung erfolgte durch kontinuierlichen Helium-Fluss über einen per „Oxford Intelligent Temperature Controller“ (ITC 503S) kontrollierten Cryostaten (CF935, Oxford Instruments). Alle Messungen erfolgten mit der vier-Puls-Sequenz: $\pi/2(\nu_{\text{obs}}) - \tau_1 - \pi(\nu_{\text{obs}}) - t' - \pi(\nu_{\text{pump}}) - (\tau_1 + \tau_2 - t') - \pi(\nu_{\text{obs}}) - \tau_2 - \text{echo}$ (Pannier et al., 2000). Die Zeit t' wurde variiert, τ_1 und τ_2 wurden dagegen konstant gehalten. Daten wurden nur für Werte $t > 0$ (dipolare Evolutionszeit, $t = t' - \tau_1$) analysiert. Der Resonator wurde überkoppelt und die *pump*-Frequenz (ν_{pump}) auf das Zentrum des Resonator-Dips fokussiert, an dem das maximale Nitroxid-Spektrum ermittelt wurde. Die *observer*-Frequenz (ν_{obs}) war um 65 MHz höher als die *pump*-Frequenz. Alle Messungen wurden im Niedrigtemperaturbereich von 50 K mit *observer*-Pulslängen von 16 ns ($\pi/2$ -Puls) bzw. 32 ns (π -Puls) und einer *pump*-Pulslänge von 12 ns durchgeführt. Durch Addierung von Spuren mit acht verschiedenen τ_1 -Werten ($\tau_{1,0} = 200$ ns mit $\Delta\tau_1 = 8$ ns) wurde die Protonen-Modulation gemittelt. Daten wurden in Schritten von 8 ns oder 16 ns bei einer Gesamtmessdauer von 24 – 48 h pro Probe aufgenommen. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software DEERAnalysis2011 (Jeschke et al., 2006).

4.25 Detektion von proteingebundenem Biotin mittel LC/MS-TOF

Der Nachweis von Biotin an isolierten BioM₂NY-Komplexen oder BioY erfolgte per HPLC-gekoppelter Massenspektrometrie (LC/MS-TOF) nach einem in einer früheren Arbeit etablierten Protokoll (Kirsch et al., 2012). Isolierte, detergenzsolubilisierete Proteine wurden in Grundpuffer I mit 0,05 % DDM (w/v) auf eine Konzentration von 10 μM gebracht und 200 μl (2 nmol) davon für zehn Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach anschließender, zehnminütiger Zentrifugation der Proben bei 15.000 rpm wurden etwa 180 μl des Überstandes abgenommen und in HPLC-Röhrchen überführt. Dreimal 50 μl einer Probe wurden in einem *high performance*-Flüssigchromatographen (Agilent 1200) mit einer Zorbax 300SB C18-Säule isokratisch in 25 % (v/v H₂O_{dd}) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Formiat bei 0,1 ml/min aufgetrennt. Die Eluate wurden in ein Agilent 1200 MDS-Flugzeit-Spektrometer (ESI-TOF, *Electrospray Ionization Time-Of-Flight*) übertragen und mit Stickstoff als Trägergas bei 350 °C mit 12 l/min analysiert. Die Kapillarspannung betrug 3000 V, die *cone*-Spannung 250 V und die

Fragmentorspannung 150 V. Die Analyse der Spektraldaten erfolgte im Bereich der Ladung-zu-Masse-Verhältnisse von 205 bis 400, Biotin wurde dabei in Form seiner Natrium- (Biotin-Na bei 267,0774) und Protonenaddukte (Biotin-H bei 245,0945) im *total-ion*-Chromatogramm identifiziert. Zur Quantifizierung wurden die entsprechenden Chromatogramme extrahiert und die Flächen unter den Diagrammen mithilfe der Software Agilent MASSHUNTER integriert. Die Kalibrierung der Peak-Flächen erfolgte über die Analyse definierter Biotinmengen zwischen 200 pmol und 1 nmol. Das in 50 µl Probenüberstand detektierte Biotin entspricht der von 500 pmol Protein gebundenen Menge.

4.26 Nachweis radioaktiv markierter Substrate mittels Flüssigkeitsszintillation

Für einen quantitativen und sensitiven Substratnachweis an Transportern in der Zellhülle ganzer Zellen (*in vivo*) oder an isolierten Proteinen (*in vitro*) wurden mit Tritium (^3H) markiertes Biotin und $^{57}\text{CoCl}_2$ verwendet. ^{57}Co wird durch Elektroneneinfang in das instabile Isotop ^{57}Fe umgewandelt, das unter Emission von Gamma-Strahlung zerfällt; die Halbwertszeit beträgt 271,79 Tage. Tritium ist ein Beta-Strahler mit einer Halbwertszeit von 12,32 Jahren, welcher unter Emission eines Elektrons und eines Antineutrinos in das Heliumisotop ^3He zerfällt. Die dabei frei werdende Energie ist mit 18,6 keV relativ gering (Korea Atomic Energy Research Institute, 2016) und wird in Wasser innerhalb weniger Millimeter absorbiert. Der Nachweis erfolgt mithilfe eines Szintillationszählers. In einem Szintillationsmix wird die ionisierende Strahlung durch ein aromatisches Lösungsmittel in Anregungsenergie für primäre und sekundäre Fluorophore umgewandelt, deren emittierte Photonen zu den Beta-Teilchen proportional sind (Stolz, 2005). Durch eine interne Kalibrierung erfolgt die Umrechnung von Zählungen (CPM - *counts per minute*) in Zerfälle pro Minute (DPM - *disintegrations per minute*), die ein Maß für die Aktivität darstellen.

4.26.1 Detektion von zellassoziertem [^3H]Biotin

Zellen einer Übernachtskultur in LB-Medium mit Antibiotika und 1 mM IPTG wurden abzentrifugiert, zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen und auf eine OD_{578} von 0,4 eingestellt. Nach Zugabe des gleichen Volumens einer 8 nM [^3H]Biotinlösung in Phosphatpuffer mit einer Aktivität von 4,44 Ci/mmol wurden die Zellen für 3,5 h unter Schütteln bei 37 °C weiter inkubiert. 0,5 ml der Zellsuspension wurden anschließend über einen Zellulosefilter gegeben, mit 5 ml Phosphatpuffer gewaschen und der Filter in 3 ml Szintillationsmix (AquaSafe 300 Plus,

Zinsser Analytic) überführt. Die Messung der mit den Filtern assoziierten Radioaktivität erfolgte mittels eines Szintillationszählers von Perkin Elmer (Packard TriCarb 2900 TR), zur Kalibrierung wurde parallel die von einer definierten Menge [^3H]Biotin ausgehende Radioaktivität ermittelt. Um die ermittelte Aktivität in die spezifische Biotinaufnahme (pmol Biotin/mg Protein) umrechnen zu können, wurde für jede Probe noch einmal die Zelldichte (OD_{578}) bestimmt. Die Berechnung erfolgte auf der Grundlage der in einer früheren Arbeit bestimmten Proteinmenge von 260 mg Protein pro 1 ml Zellen bei einer OD_{578} von 1 (Hebbeln et al., 2007).

4.26.2 Detektion von zellassoziertem $^{57}\text{Co}^{2+}$

Zum Nachweis einer Kobaltakkumulation durch rekombinante *E. coli* XL1-Blue wurden entsprechende Zellen in LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C angezogen und anschließend im Verhältnis 1:100 in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin und 1 mM IPTG überimpft. Dieser Suspension wurden 17,5 µl einer 173 µM $^{57}\text{CoCl}_2$ -Arbeitslösung mit einer Aktivität von etwa 25 kBq/µl zugefügt, sodass die Endkonzentration von $^{57}\text{CoCl}_2$ 500 nM entsprach. Nach weiterer siebenstündiger Inkubation wurden 2 ml der Zellsuspension für 3 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, das Pellet zweimal in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen und schließlich in 200 µl des Puffer aufgenommen. Für den Kobaltnachweis wurden 100 µl der konzentrierten Zellsuspension mit 3 ml Szintillationscocktail (Aquasafe 300 Plus, Zinsser Analytic) gemischt und in einem Szintillationszählgerät (Packard TriCarb 2900 TR, Perkin Elmer) unter Nutzung des ^{57}Co -spezifischen Zählprogrammes vermessen. Die Berechnung der pro 1 mg Protein aufgenommenen Kobaltmenge erfolgte analog zu Abschnitt 4.26.1. Dazu wurde die ermittelte Radioaktivität mithilfe definierter Mengen von $^{57}\text{CoCl}_2$ kalibriert und die Zelldichte (OD_{578}) der vermessenen Zellsuspensionen bestimmt.

4.26.3 Detektion von proteingebundenem [^3H]Biotin

In Nanodiscs rekonstituierte BioM₂NY-Komplexe (200 pmol/200 µl) wurden mit 1 nmol [^3H]Biotin (89 Ci/mmol) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Optional wurden 2 mM ATP mit 0,5 mM EDTA oder mit 2,5 mM MgCl_2 hinzugefügt. Ungebundene Substrate wurden über eine G-25 Entsalzungssäule (GE Healthcare) entfernt und anschließend die mit 50 pmol Protein assoziierte Radioaktivität in 3 ml Szintillationsmix im Szintillationszähler (TriCarb2600, Perkin Elmer) bestimmt. Zur Kalibrierung wurde auch hier die von einer definierten Menge [^3H]Biotin ausgehende Radioaktivität ermittelt. Die verbliebene Probe wurde für eine

Überprüfung der Proteinmenge per SDS-PAGE und Pixelanalyse mithilfe der Software GELSCAN 5 aufgehoben.

Zum Nachweis der [^3H]Biotinbindung durch Transporter-Komplexe in Detergenzlösung wurden 2,5 nmol BioM₂NY (2,5 μM) mit 0,25 ml äquilibrierter Ni-NTA-Agarosematrix (mit Grundpuffer I mit 0,05 % [w/v] DDM auf 1 ml aufgefüllt) für einige Stunden oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. In parallelen Ansätzen wurden 50 nmol Biotin (50 μM) oder Biotin mit 2 mM ATP mit 0,5 mM EDTA bzw. 5 mM MgCl₂ zugefügt. Die Abtrennung von ungebundenen Substraten erfolgte über Waschen der Matrix-gebundenen Proteine in einem 5 ml-Säulchen mit zunächst 5 ml Grundpuffer I (s. Abschnitt 4.13.5) mit 0,05 % (w/v) DDM und anschließend 5 ml Grundpuffer I mit 0,05 % (w/v) DDM und 100 mM Imidazol. Nach Elution der übrigen Komplexe mit 10 x 100 μl Elutionspuffer (Grundpuffer II mit 0,05 % [w/v] DDM, s. Abschnitt 4.13.5) und Konzentration der Eluate auf etwa 125 μl wurden zweimal 50 μl in je 3 ml Szintillationsmix gegeben und die assoziierte Radioaktivität bestimmt. Die restlichen 25 μl wurden für eine Quantifizierung der Ansätze per SDS-PAGE mit anschließender Pixelanalyse bereitgehalten.

Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, Y. M. und Belland, R. J. (2005): The chlamydial developmental cycle, FEMS Microbiol Rev 29 [5], Seite 949-59.
- Alfandega, A. (2008): Reinigung, Charakterisierung und Rekonstitution in Proteoliposomen eines prokaryotischen Biotintransporters mit ungewöhnlichen Eigenschaften., Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Altenbach, C.; Flitsch, S. L.; Khorana, H. G. und Hubbell, W. L. (1989): Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines, Biochemistry 28 [19], Seite 7806-12.
- Alvarez, F. J.; Orelle, C. und Davidson, A. L. (2010): Functional reconstitution of an ABC transporter in nanodiscs for use in electron paramagnetic resonance spectroscopy, J Am Chem Soc 132 [28], Seite 9513-5.
- Ames, G. F.; Nikaido, K.; Wang, I. X.; Liu, P. Q.; Liu, C. E. und Hu, C. (2001): Purification and characterization of the membrane-bound complex of an ABC transporter, the histidine permease, J Bioenerg Biomembr 33 [2], Seite 79-92.
- Austermuhle, M. I.; Hall, J. A.; Klug, C. S. und Davidson, A. L. (2004): Maltose-binding protein is open in the catalytic transition state for ATP hydrolysis during maltose transport, J Biol Chem 279 [27], Seite 28243-50.
- Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K. A.; Tomita, M.; Wanner, B. L. und Mori, H. (2006): Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, Mol Syst Biol 2, Seite 2006 0008.
- Bao, H. und Duong, F. (2013): ATP alone triggers the outward facing conformation of the maltose ATP-binding cassette transporter, J Biol Chem 288 [5], Seite 3439-48.
- Bayburt, T. H. und Sligar, S. G. (2010): Membrane protein assembly into Nanodiscs, FEBS Lett 584 [9], Seite 1721-7.
- Berger, E. A. und Heppel, L. A. (1974): Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*, J Biol Chem 249 [24], Seite 7747-55.
- Berntsson, R. P.; ter Beek, J.; Majsnerowska, M.; Durkens, R. H.; Puri, P.; Poolman, B. und Slotboom, D. J. (2012): Structural divergence of paralogous S components from ECF-type ABC transporters, Proc Natl Acad Sci U S A 109 [35], Seite 13990-5.
- Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, J Bacteriol 62 [3], Seite 293-300.
- Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T.; Kiefer, F.; Gallo Cassarino, T.; Bertoni, M.; Bordoli, L. und Schwede, T. (2014): SWISS-MODEL:

- modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, *Nucleic Acids Res* 42 [Web Server issue], Seite W252-8.
- Biemans-Oldehinkel, E.; Doeven, M. K. und Poolman, B. (2006): ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains, *FEBS Lett* 580 [4], Seite 1023-35.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G., 3rd; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B. und Shao, Y. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* 277 [5331], Seite 1453-62.
- Böhm, S.; Licht, A.; Wuttge, S.; Schneider, E. und Bordinon, E. (2013): Conformational plasticity of the type I maltose ABC importer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 [14], Seite 5492-7.
- Borch, J. und Hamann, T. (2009): The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies, *Biol Chem* 390 [8], Seite 805-14.
- Borths, E. L.; Locher, K. P.; Lee, A. T. und Rees, D. C. (2002): The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [26], Seite 16642-7.
- Bose, S. J.; Scott-Ward, T. S.; Cai, Z. und Sheppard, D. N. (2015): Exploiting species differences to understand the CFTR Cl⁻ channel, *Biochem Soc Trans* 43 [5], Seite 975-82.
- Bower, S.; Perkins, J.; Yocum, R. R.; Serron, P.; Sorokin, A.; Rahaim, P.; Howitt, C. L.; Prasad, N.; Ehrlich, S. D. und Pero, J. (1995): Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* *birA* gene encoding a repressor of the biotin operon, *J Bacteriol* 177 [9], Seite 2572-5.
- Brenner, Don J; Krieg, NR; Staley, JT und Garrity, GM (2005): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2: The Proteobacteria, NY: Springer.
- Brune, Iris; Götter, Susanne; Schneider, Jessica; Rodionov, Dmitry A. und Tauch, Andreas (2012): Negative transcriptional control of biotin metabolism genes by the TetR-type regulator BioQ in biotin-auxotrophic *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Journal of Biotechnology* 159 [3], Seite 225-234.
- Burgess, C. M.; Slotboom, D. J.; Geertsma, E. R.; Duurkens, R. H.; Poolman, B. und van Sinderen, D. (2006): The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis*: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism, *J Bacteriol* 188 [8], Seite 2752-60.
- Callaghan, R. (2015): Providing a molecular mechanism for P-glycoprotein; why would I bother?, *Biochem Soc Trans* 43 [5], Seite 995-1002.
- Campbell, A.; Chang, R.; Barker, D. und Ketner, G. (1980): Biotin regulatory (*bir*) mutations of *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 142 [3], Seite 1025-8.

- Chai, C.; Yu, Y.; Zhuo, W.; Zhao, H.; Li, X.; Wang, N.; Chai, J. und Yang, M. (2013): Structural basis for a homodimeric ATPase subunit of an ECF transporter, *Protein Cell* 4 [10], Seite 793-801.
- Chen, J. (2013): Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter, *Curr Opin Struct Biol* 23 [4], Seite 492-8.
- Chen, J.; Lu, G.; Lin, J.; Davidson, A. L. und Quirocho, F. A. (2003): A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle, *Mol Cell* 12 [3], Seite 651-61.
- Chen, J.; Sharma, S.; Quirocho, F. A. und Davidson, A. L. (2001): Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [4], Seite 1525-30.
- Chen, S.; Oldham, M. L.; Davidson, A. L. und Chen, J. (2013): Carbon catabolite repression of the maltose transporter revealed by X-ray crystallography, *Nature* 499 [7458], Seite 364-8.
- Cherepanov, P. P. und Wackernagel, W. (1995): Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant, *Gene* 158 [1], Seite 9-14.
- Chifflet, S.; Torriglia, A.; Chiesa, R. und Tolosa, S. (1988): A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases, *Anal Biochem* 168 [1], Seite 1-4.
- Choi-Rhee, E. und Cronan, J. E. (2005): Biotin synthase is catalytic *in vivo*, but catalysis engenders destruction of the protein, *Chem Biol* 12 [4], Seite 461-8.
- Choi-Rhee, E.; Schulman, H. und Cronan, J. E. (2004): Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase, *Protein Sci* 13 [11], Seite 3043-50.
- Cronan, J. E., Jr. (1989): The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme, *Cell* 58 [3], Seite 427-9.
- Cymer, Florian; Veerappan, Anbazhagan und Schneider, Dirk (2012): Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818 [4], Seite 963-973.
- Daberkow, R. L.; White, B. R.; Cederberg, R. A.; Griffin, J. B. und Zemleni, J. (2003): Monocarboxylate transporter 1 mediates biotin uptake in human peripheral blood mononuclear cells, *J Nutr* 133 [9], Seite 2703-6.
- Dassa, E. und Bouige, P. (2001): The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms, *Res Microbiol* 152 [3-4], Seite 211-29.
- Daus, M. L.; Grote, M.; Muller, P.; Doebber, M.; Herrmann, A.; Steinhoff, H. J.; Dassa, E. und Schneider, E. (2007): ATP-driven MalK dimer closure and reopening and

- conformational changes of the "EAA" motifs are crucial for function of the maltose ATP-binding cassette transporter (MalFGK2), J Biol Chem 282 [31], Seite 22387-96.
- Davidson, A. L. und Chen, J. (2004): ATP-binding cassette transporters in bacteria, Annu Rev Biochem 73, Seite 241-68.
- Davidson, A. L.; Dassa, E.; Orelle, C. und Chen, J. (2008): Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems, Microbiol Mol Biol Rev 72 [2], Seite 317-64, table of contents.
- Davidson, A. L. und Maloney, P. C. (2007): ABC transporters: how small machines do a big job, Trends Microbiol 15 [10], Seite 448-55.
- Davidson, A. L. und Sharma, S. (1997): Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*, J Bacteriol 179 [17], Seite 5458-64.
- Davidson, A. L.; Shuman, H. A. und Nikaido, H. (1992): Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins, Proc Natl Acad Sci U S A 89 [6], Seite 2360-4.
- Dawson, R. J.; Hollenstein, K. und Locher, K. P. (2007): Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism, Mol Microbiol 65 [2], Seite 250-7.
- Dawson, R. J. und Locher, K. P. (2006): Structure of a bacterial multidrug ABC transporter, Nature 443 [7108], Seite 180-5.
- De la Rosa, M. B. und Nelson, S. W. (2011): An interaction between the Walker A and D-loop motifs is critical to ATP hydrolysis and cooperativity in bacteriophage T4 Rad50, J Biol Chem 286 [29], Seite 26258-66.
- de Wet, H. und Proks, P. (2015): Molecular action of sulphonylureas on KATP channels: a real partnership between drugs and nucleotides, Biochem Soc Trans 43 [5], Seite 901-7.
- Doyle, L. A.; Yang, W.; Rishi, A. K.; Gao, Y. und Ross, D. D. (1996): H19 gene overexpression in atypical multidrug-resistant cells associated with expression of a 95-kilodalton membrane glycoprotein, Cancer Res 56 [13], Seite 2904-7.
- Dunn, MF; Araiza, G und Encarnación, S (2002): Characteristics and metabolic roles of biotin-dependent carboxylases in rhizobia, Nitrogen fixation: global perspectives. CAB International, Wallingford, Seite 158-162.
- Duurkens, R. H.; Tol, M. B.; Geertsma, E. R.; Permentier, H. P. und Slotboom, D. J. (2007): Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU, J Biol Chem 282 [14], Seite 10380-6.
- Eisenberg, D.; Luthy, R. und Bowie, J. U. (1997): VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles, Methods Enzymol 277, Seite 396-404.

- Eisenberg, M. A. (1975): Mode of action of alpha-dehydrobiotin, a biotin analogue, J Bacteriol 123 [1], Seite 248-54.
- Eitinger, T.; Rodionov, D. A.; Grote, M. und Schneider, E. (2011): Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions, FEMS Microbiol Rev 35 [1], Seite 3-67.
- Erkens, G. B.; Berntsson, R. P.; Fulyani, F.; Majsnerowska, M.; Vujičić-Žagar, A.; Ter Beek, J.; Poolman, B. und Slotboom, D. J. (2011): The structural basis of modularity in ECF-type ABC transporters, Nat Struct Mol Biol 18 [7], Seite 755-60.
- Eudes, A.; Erkens, G. B.; Slotboom, D. J.; Rodionov, D. A.; Naponelli, V. und Hanson, A. D. (2008): Identification of genes encoding the folate- and thiamine-binding membrane proteins in Firmicutes, J Bacteriol 190 [22], Seite 7591-4.
- Feng, Y.; Zhang, H. und Cronan, J. E. (2013): Profligate biotin synthesis in alpha-proteobacteria - a developing or degenerating regulatory system?, Mol Microbiol 88 [1], Seite 77-92.
- Finkenwirth, F.; Neubauer, O.; Gunzenhäuser, J.; Schoknecht, J.; Scolari, S.; Stöckl, M.; Korte, T.; Herrmann, A. und Eitinger, T. (2010): Subunit composition of an energy-coupling-factor-type biotin transporter analysed in living bacteria, Biochem J 431 [3], Seite 373-80.
- Finkenwirth, F.; Sippach, M.; Landmesser, H.; Kirsch, F.; Ogienko, A.; Grunzel, M.; Kiesler, C.; Steinhoff, H. J.; Schneider, E. und Eitinger, T. (2015): ATP-dependent Conformational Changes Trigger Substrate Capture and Release by an ECF-type Biotin Transporter, J Biol Chem 290 [27], Seite 16929-42.
- Fisher, D. J.; Fernandez, R. E.; Adams, N. E. und Maurelli, A. T. (2012): Uptake of biotin by *Chlamydia* Spp. through the use of a bacterial transporter (BioY) and a host-cell transporter (SMVT), PLoS One 7 [9], Seite e46052.
- Gerber, S.; Comellas-Bigler, M.; Goetz, B. A. und Locher, K. P. (2008): Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter, Science 321 [5886], Seite 246-50.
- Gilson, E.; Higgins, C. F.; Hofnung, M.; Ferro-Luzzi Ames, G. und Nikaido, H. (1982): Extensive homology between membrane-associated components of histidine and maltose transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, J Biol Chem 257 [17], Seite 9915-8.
- Gottesman, M. M. und Pastan, I. (1993): Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, Annu Rev Biochem 62, Seite 385-427.
- Green, N. J.; Grundy, F. J. und Henkin, T. M. (2010): The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule, FEBS Lett 584 [2], Seite 318-24.
- Grinkova, Y. V.; Denisov, I. G. und Sligar, S. G. (2010): Engineering extended membrane scaffold proteins for self-assembly of soluble nanoscale lipid bilayers, Protein Eng Des Sel 23 [11], Seite 843-8.

- Grote, M.; Bordignon, E.; Polyhach, Y.; Jeschke, G.; Steinhoff, H. J. und Schneider, E. (2008): A comparative electron paramagnetic resonance study of the nucleotide-binding domains' catalytic cycle in the assembled maltose ATP-binding cassette importer, *Biophys J* 95 [6], Seite 2924-38.
- Grote, M.; Polyhach, Y.; Jeschke, G.; Steinhoff, H. J.; Schneider, E. und Bordignon, E. (2009): Transmembrane signaling in the maltose ABC transporter MalFGK2-E: periplasmic MalF-P2 loop communicates substrate availability to the ATP-bound MalK dimer, *J Biol Chem* 284 [26], Seite 17521-6.
- Grunzel, M. (2015): ATP-induzierte Konformationsänderungen der S-Einheit eines ECF-Transporters, Masterarbeit, Institut für Biologie der Lebenswissenschaftlichen Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Guillén-Navarro, K.; Araiza, G.; Garcia-de los Santos, A.; Mora, Y. und Dunn, M. F. (2005): The *Rhizobium etli* *bioMNY* operon is involved in biotin transport, *FEMS Microbiol Lett* 250 [2], Seite 209-19.
- Guillén-Navarro, Karina; Encarnación, Sergio und Dunn, Michael F. (2005): Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia, *FEMS Microbiology Letters* 246 [2], Seite 159-165.
- Harrison, F. H. und Harwood, C. S. (2005): The *pimFABCDE* operon from *Rhodopseudomonas palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation, *Microbiology* 151 [Pt 3], Seite 727-36.
- Hebbeln, P.; Rodionov, D. A.; Alfandega, A. und Eitinger, T. (2007): Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [8], Seite 2909-14.
- Henderson, G. B.; Zevely, E. M. und Huennekens, F. M. (1979): Mechanism of folate transport in *Lactobacillus casei*: evidence for a component shared with the thiamine and biotin transport systems, *J Bacteriol* 137 [3], Seite 1308-14.
- Heuveling, J.; Frochaux, V.; Ziolkowska, J.; Wawrzinek, R.; Wessig, P.; Herrmann, A. und Schneider, E. (2014): Conformational changes of the bacterial type I ATP-binding cassette importer HisQMP2 at distinct steps of the catalytic cycle, *Biochim Biophys Acta* 1838 [1 Pt B], Seite 106-16.
- Higgins, C. F.; Haag, P. D.; Nikaido, K.; Ardeschir, F.; Garcia, G. und Ames, G. F. (1982): Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*, *Nature* 298 [5876], Seite 723-7.
- Higgins, C. F.; Hiles, I. D.; Salmond, G. P.; Gill, D. R.; Downie, J. A.; Evans, I. J.; Holland, I. B.; Gray, L.; Buckel, S. D.; Bell, A. W. und et al. (1986): A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria, *Nature* 323 [6087], Seite 448-50.
- Hlaváč, V. und Souček, P. (2015): Role of family D ATP-binding cassette transporters (ABCD) in cancer, *Biochem Soc Trans* 43 [5], Seite 937-42.

- Hoffmann, S. K.; Goslar, J. und Lijewski, S. (2013): Electron Paramagnetic Resonance and Electron Spin Echo Studies of Co^{2+} Coordination by Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD^+) in Water Solution, *Appl Magn Reson* 44 [7], Seite 817-826.
- Hollenstein, K.; Frei, D. C. und Locher, K. P. (2007): Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein, *Nature* 446 [7132], Seite 213-6.
- Holm, L. und Laakso, L. M. (2016): Dali server update, *Nucleic Acids Res* 44 [W1], Seite W351-5.
- Hopfner, K. P.; Karcher, A.; Shin, D. S.; Craig, L.; Arthur, L. M.; Carney, J. P. und Tainer, J. A. (2000): Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily, *Cell* 101 [7], Seite 789-800.
- Hsu, W. L.; Furuta, T. und Sakurai, M. (2016): The ATP Hydrolysis Mechanism in a Maltose Transporter Explored by QM/MM Metadynamics Simulation, *J Phys Chem B*.
- Hung, L. W.; Wang, I. X.; Nikaido, K.; Liu, P. Q.; Ames, G. F. und Kim, S. H. (1998): Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter, *Nature* 396 [6712], Seite 703-7.
- Hvorup, R. N.; Goetz, B. A.; Niederer, M.; Hollenstein, K.; Perozo, E. und Locher, K. P. (2007): Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF, *Science* 317 [5843], Seite 1387-90.
- Hyde, S. C.; Emsley, P.; Hartshorn, M. J.; Mimmack, M. M.; Gileadi, U.; Pearce, S. R.; Gallagher, M. P.; Gill, D. R.; Hubbard, R. E. und Higgins, C. F. (1990): Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport, *Nature* 346 [6282], Seite 362-5.
- Jardetzky, O. (1966): Simple allosteric model for membrane pumps, *Nature* 211 [5052], Seite 969-70.
- Jeschke, G. (2012): DEER distance measurements on proteins, *Annu Rev Phys Chem* 63, Seite 419-46.
- Jeschke, G.; Chechik, V.; Ionita, P.; Godt, A.; Zimmermann, H.; Banham, J.; Timmel, C. R.; Hilger, D. und Jung, H. (2006): DeerAnalysis2006—a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data, *Applied Magnetic Resonance* 30 [3], Seite 473-498.
- Jones, P. M. und George, A. M. (2012): Role of the D-loops in allosteric control of ATP hydrolysis in an ABC transporter, *J Phys Chem A* 116 [11], Seite 3004-13.
- Josts, I.; Almeida Hernandez, Y.; Andreeva, A. und Tidow, H. (2016): Crystal Structure of a Group I Energy Coupling Factor Vitamin Transporter S Component in Complex with Its Cognate Substrate, *Cell Chem Biol* 23 [7], Seite 827-36.

- Kadaba, N. S.; Kaiser, J. T.; Johnson, E.; Lee, A. und Rees, D. C. (2008): The high-affinity *E. coli* methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation, *Science* 321 [5886], Seite 250-3.
- Kang, J. (2011): Plant ABC Transporters 9.
- Karpowich, N. K.; Song, J. M.; Cocco, N. und Wang, D. N. (2015): ATP binding drives substrate capture in an ECF transporter by a release-and-catch mechanism, *Nat Struct Mol Biol* 22 [7], Seite 565-71.
- Karpowich, N. K.; Song, J. und Wang, D. N. (2016): An Aromatic Cap Seals the Substrate Binding Site in an ECF-Type S Subunit for Riboflavin, *J Mol Biol* 428 [15], Seite 3118-30.
- Karpowich, N. K. und Wang, D. N. (2013): Assembly and mechanism of a group II ECF transporter, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 [7], Seite 2534-9.
- Khare, D.; Oldham, M. L.; Orelle, C.; Davidson, A. L. und Chen, J. (2009): Alternating access in maltose transporter mediated by rigid-body rotations, *Mol Cell* 33 [4], Seite 528-36.
- Kiesler, C. (2013): Bedeutung der ersten Transmembranhelix von BioY für Protein-Protein-Interaktionen in einem Biotin Transporter, Bachelorarbeit, Institut für Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Kirsch, F. (2015): Analyse der Substratbindestelle, der Stöchiometrie und der Transportfunktion von S-Einheiten bakterieller ECF-Transporter, Dissertation, Institut für Biologie der Lebenswissenschaftlichen Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Kirsch, F. und Eitinger, T. (2014): Transport of nickel and cobalt ions into bacterial cells by S components of ECF transporters, *Biometals* 27 [4], Seite 653-60.
- Kirsch, F.; Frielingsdorf, S.; Pohlmann, A.; Ziomkowska, J.; Herrmann, A. und Eitinger, T. (2012): Essential amino acid residues of BioY reveal that dimers are the functional S unit of the *Rhodobacter capsulatus* biotin transporter, *J Bacteriol* 194 [17], Seite 4505-12.
- Klare, J. P. und Steinhoff, H. J. (2009): Spin labeling EPR, *Photosynth Res* 102 [2-3], Seite 377-90.
- Kleiger, G.; Grothe, R.; Mallick, P. und Eisenberg, D. (2002): GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles, *Biochemistry* 41 [19], Seite 5990-7.
- Klose, D.; Klare, J. P.; Grohmann, D.; Kay, C. W.; Werner, F. und Steinhoff, H. J. (2012): Simulation vs. reality: a comparison of in silico distance predictions with DEER and FRET measurements, *PLoS One* 7 [6], Seite e39492.
- Kobashi, K. (1968): Catalytic oxidation of sulfhydryl groups by o-phenanthroline copper complex, *Biochim Biophys Acta* 158 [2], Seite 239-45.

- Korea Atomic Energy Research Institute (2016): Table of Nuclides, Aktuelle Version
- Korkhov, V. M.; Mireku, S. A. und Locher, K. P. (2012): Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD-F, *Nature* 490 [7420], Seite 367-72.
- Kwon, K. und Beckett, D. (2000): Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases, *Protein Sci* 9 [8], Seite 1530-9.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], Seite 680-5.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S. und Thornton, J. M. (1993): PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *Journal of Applied Crystallography* 26 [2], Seite 283-291.
- Lewinson, O.; Lee, A. T.; Locher, K. P. und Rees, D. C. (2010): A distinct mechanism for the ABC transporter BtuCD-BtuF revealed by the dynamics of complex formation, *Nat Struct Mol Biol* 17 [3], Seite 332-8.
- Li, H.; Karl, T. und Garner, B. (2015): Understanding the function of ABCA7 in Alzheimer's disease, *Biochem Soc Trans* 43 [5], Seite 920-3.
- Lin, S. und Cronan, J. E. (2011): Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis, *Mol Biosyst* 7 [6], Seite 1811-21.
- Lin, S. und Cronan, J. E. (2012): The BioC O-methyltransferase catalyzes methyl esterification of malonyl-acyl carrier protein, an essential step in biotin synthesis, *J Biol Chem* 287 [44], Seite 37010-20.
- Linton, K. J. und Higgins, C. F. (1998): The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins, *Mol Microbiol* 28 [1], Seite 5-13.
- Livnat-Levanon, N.; A, I. Gilson; Ben-Tal, N. und Lewinson, O. (2016): The uncoupled ATPase activity of the ABC transporter BtuC2D2 leads to a hysteretic conformational change, conformational memory, and improved activity, *Sci Rep* 6, Seite 21696.
- Locher, K. P. (2009): Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364 [1514], Seite 239-45.
- Locher, K. P.; Lee, A. T. und Rees, D. C. (2002): The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism, *Science* 296 [5570], Seite 1091-8.
- Loo, T. W. und Clarke, D. M. (2001): Determining the dimensions of the drug-binding domain of human P-glycoprotein using thiol cross-linking compounds as molecular rulers, *J Biol Chem* 276 [40], Seite 36877-80.
- Lu, G.; Westbrook, J. M.; Davidson, A. L. und Chen, J. (2005): ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [50], Seite 17969-74.

- Ludwig, A.; Stolz, J. und Sauer, N. (2000): Plant sucrose- H^+ symporters mediate the transport of vitamin H, *Plant J* 24 [4], Seite 503-9.
- Magnúsdóttir, SÍ; Ravcheev, D.; de Crécy-Lagard, Vé und Thiele, I. (2015): Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes, *Front Genet* 6.
- Majsnerowska, M.; Hanelt, I.; Wunnicke, D.; Schafer, L. V.; Steinhoff, H. J. und Slotboom, D. J. (2013): Substrate-induced conformational changes in the S-component ThiT from an energy coupling factor transporter, *Structure* 21 [5], Seite 861-7.
- Majsnerowska, M.; Ter Beek, J.; Stanek, W. K.; Duurkens, R. H. und Slotboom, D. J. (2015): Competition between Different S-Components for the Shared Energy Coupling Factor Module in Energy Coupling Factor Transporters, *Biochemistry* 54 [31], Seite 4763-6.
- McGrew, Dharia A. und Knight, Kendall L. (2006): RecA Superfamily Proteins, *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Misra, Sushil K. und Freed, Jack H. (2011): Distance Measurements: Continuous-Wave (CW)- and Pulsed Dipolar EPR, Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance Seite 545-588, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Moody, J. E.; Millen, L.; Binns, D.; Hunt, J. F. und Thomas, P. J. (2002): Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters, *J Biol Chem* 277 [24], Seite 21111-4.
- Morbach, S.; Tebbe, S. und Schneider, E. (1993): The ATP-binding cassette (ABC) transporter for maltose/maltodextrins of *Salmonella typhimurium*. Characterization of the ATPase activity associated with the purified MalK subunit, *J Biol Chem* 268 [25], Seite 18617-21.
- Morrison, E. A.; DeKoster, G. T.; Dutta, S.; Vafabakhsh, R.; Clarkson, M. W.; Bahl, A.; Kern, D.; Ha, T. und Henzler-Wildman, K. A. (2011): Antiparallel EmrE exports drugs by exchanging between asymmetric structures, *Nature* 481 [7379], Seite 45-50.
- Mourez, M.; Hofnung, M. und Dassa, E. (1997): Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits, *Embo j* 16 [11], Seite 3066-77.
- Neubauer, O. (2013): Stöchiometrie und Interaktionen der Untereinheiten von ECF-Transportern, Dissertation, Institut für Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Neubauer, O.; Alfandega, A.; Schoknecht, J.; Sternberg, U.; Pohlmann, A. und Eitinger, T. (2009): Two essential arginine residues in the T components of energy-coupling factor transporters, *J Bacteriol* 191 [21], Seite 6482-8.

- Neubauer, O.; Reiffler, C.; Behrendt, L. und Eitinger, T. (2011): Interactions among the A and T units of an ECF-type biotin transporter analyzed by site-specific crosslinking, PLoS One 6 [12], Seite e29087.
- Ogienko, A. (2014): Interaktion zweier Untereinheiten eines Biotin-Transporters vom ECF-Typ während des Katalyse-Zyklus, Bachelorarbeit, Institut für Biologie der Lebenswissenschaftliche Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Ohwada, K. (1972): Bioassay of biotin and its distribution in the sea, Marine Biology 14 [1], Seite 10-17.
- Oldham, M. L. und Chen, J. (2011): Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state, Science 332 [6034], Seite 1202-5.
- Oldham, M. L. und Chen, J. (2011): Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis, Proc Natl Acad Sci U S A 108 [37], Seite 15152-6.
- Oldham, M. L.; Chen, S. und Chen, J. (2013): Structural basis for substrate specificity in the *Escherichia coli* maltose transport system, Proc Natl Acad Sci U S A 110 [45], Seite 18132-7.
- Oldham, M. L.; Davidson, A. L. und Chen, J. (2008): Structural insights into ABC transporter mechanism, Curr Opin Struct Biol 18 [6], Seite 726-33.
- Oldham, M. L.; Khare, D.; Quijcho, F. A.; Davidson, A. L. und Chen, J. (2007): Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter, Nature 450 [7169], Seite 515-21.
- Orelle, C.; Ayvaz, T.; Everly, R. M.; Klug, C. S. und Davidson, A. L. (2008): Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter, Proc Natl Acad Sci U S A 105 [35], Seite 12837-42.
- Orelle, C.; Dalmas, O.; Gros, P.; Di Pietro, A. und Jault, J. M. (2003): The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA, J Biol Chem 278 [47], Seite 47002-8.
- Overbeek, Ross; Begley, Tadhg; Butler, Ralph M.; Choudhuri, Jomuna V.; Chuang, Han-Yu; Cohoon, Matthew; de Crécy-Lagard, Valérie; Diaz, Naryttza; Disz, Terry; Edwards, Robert; Fonstein, Michael; Frank, Ed D.; Gerdes, Svetlana; Glass, Elizabeth M.; Goesmann, Alexander; Hanson, Andrew; Iwata-Reuyl, Dirk; Jensen, Roy; Jamshidi, Neema; Krause, Lutz; Kubal, Michael; Larsen, Niels; Linke, Burkhard; McHardy, Alice C.; Meyer, Folker; Neuweiger, Heiko; Olsen, Gary; Olson, Robert; Osterman, Andrei; Portnoy, Vasilii; Pusch, Gordon D.; Rodionov, Dmitry A.; Rückert, Christian; Steiner, Jason; Stevens, Rick; Thiele, Ines; Vassieva, Olga; Ye, Yuzhen; Zagnitko, Olga und Vonstein, Veronika (2005): The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes, Nucleic Acids Research 33 [17], Seite 5691-5702.

- Pannier, M.; Veit, S.; Godt, A.; Jeschke, G. und Spiess, H. W. (2000): Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins, *J Magn Reson* 142 [2], Seite 331-40.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C. und Ferrin, T. E. (2004): UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis, *J Comput Chem* 25 [13], Seite 1605-12.
- Pierce, B. G.; Wiehe, K.; Hwang, H.; Kim, B. H.; Vreven, T. und Weng, Z. (2014): ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers, *Bioinformatics* 30 [12], Seite 1771-3.
- Piffeteau, Annie und Gaudry, Michel (1985): Biotin uptake: influx, efflux and countertransport in *Escherichia coli* K12, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 816 [1], Seite 77-82.
- Polyhach, Yevhen; Bordignon, Enrica und Jeschke, Gunnar (2011): Rotamer libraries of spin labelled cysteines for protein studies, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 [6], Seite 2356-2366.
- Prakash, O. und Eisenberg, M. A. (1974): Active transport of biotin in *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol* 120 [2], Seite 785-91.
- Prasad, P. D.; Wang, H.; Huang, W.; Fei, Y. J.; Leibach, F. H.; Devoe, L. D. und Ganapathy, V. (1999): Molecular and functional characterization of the intestinal Na⁺-dependent multivitamin transporter, *Arch Biochem Biophys* 366 [1], Seite 95-106.
- Prasad, P. D.; Wang, H.; Kekuda, R.; Fujita, T.; Fei, Y. J.; Devoe, L. D.; Leibach, F. H. und Ganapathy, V. (1998): Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoate, *J Biol Chem* 273 [13], Seite 7501-6.
- Quenkert, M. (2013): Charakterisierung der ABC-ATPase eines Biotin- Transporters vom ECF-Typ, Bachelorarbeit.
- Quick, M. und Shi, L. (2015): The sodium/multivitamin transporter: a multipotent system with therapeutic implications, *Vitam Horm* 98, Seite 63-100.
- Quioco, F. A. und Ledvina, P. S. (1996): Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes, *Mol Microbiol* 20 [1], Seite 17-25.
- Rice, A. J.; Park, A. und Pinkett, H. W. (2014): Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49 [5], Seite 426-37.
- Ringlstetter, S. L. (2010): Identification of the biotin transporter in *Escherichia coli*, biotinylation of histones in *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae*., Naturwissenschaftliche Fakultät III, Universität Regensburg, Regensburg.

- Riordan, J. R.; Deuchars, K.; Kartner, N.; Alon, N.; Trent, J. und Ling, V. (1985): Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines, *Nature* 316 [6031], Seite 817-9.
- Rodionov, D. A. und Gelfand, M. S. (2006): Computational identification of BioR, a transcriptional regulator of biotin metabolism in Alphaproteobacteria, and of its binding signal, *FEMS Microbiol Lett* 255 [1], Seite 102-7.
- Rodionov, D. A.; Hebbeln, P.; Eudes, A.; ter Beek, J.; Rodionova, I. A.; Erkens, G. B.; Slotboom, D. J.; Gelfand, M. S.; Osterman, A. L.; Hanson, A. D. und Eitinger, T. (2009): A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes, *J Bacteriol* 191 [1], Seite 42-51.
- Rodionov, D. A.; Hebbeln, P.; Gelfand, M. S. und Eitinger, T. (2006): Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters, *J Bacteriol* 188 [1], Seite 317-27.
- Said, H. M. (2009): Cell and Molecular Aspects of Human Intestinal Biotin Absorption, *J Nutr* 139 [1], Seite 158-62.
- Saier, M. H., Jr.; Reddy, V. S.; Tsu, B. V.; Ahmed, M. S.; Li, C. und Moreno-Hagelsieb, G. (2016): The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances, *Nucleic Acids Res* 44 [D1], Seite D372-9.
- Sanger, F. und Coulson, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *J Mol Biol* 94 [3], Seite 441-8.
- Satiaputra, J.; Shearwin, K. E.; Booker, G. W. und Polyak, S. W. (2016): Mechanisms of biotin-regulated gene expression in microbes, *Synthetic and Systems Biotechnology* 1 [1], Seite 17-24.
- Schauer, K.; Stolz, J.; Scherer, S. und Fuchs, T. M. (2009): Both thiamine uptake and biosynthesis of thiamine precursors are required for intracellular replication of *Listeria monocytogenes*, *J Bacteriol* 191 [7], Seite 2218-27.
- Schnetz, K. und Rak, B. (1990): Beta-glucoside permease represses the bgl operon of *Escherichia coli* by phosphorylation of the antiterminator protein and also interacts with glucose-specific enzyme III, the key element in catabolite control, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [13], Seite 5074-8.
- Selbitschka, W.; Arnold, W.; Priefer, U. B.; Rottschäfer, T.; Schmidt, M.; Simon, R. und Puhler, A. (1991): Characterization of *recA* genes and *recA* mutants of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae, *Mol Gen Genet* 229 [1], Seite 86-95.
- Serganov, A. und Nudler, E. (2013): A decade of riboswitches, *Cell* 152 [1-2], Seite 17-24.
- Sharan, S. K.; Thomason, L. C.; Kuznetsov, S. G. und Court, D. L. (2009): Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering, *Nat Protoc* 4 [2], Seite 206-23.

- Sharma, S. und Davidson, A. L. (2000): Vanadate-induced trapping of nucleotides by purified maltose transport complex requires ATP hydrolysis, *J Bacteriol* 182 [23], Seite 6570-6.
- Shilton, B. H. (2008): The dynamics of the MBP-MalFGK(2) interaction: a prototype for binding protein dependent ABC-transporter systems, *Biochim Biophys Acta* 1778 [9], Seite 1772-80.
- Siche, S.; Neubauer, O.; Hebbeln, P. und Eitinger, T. (2010): A bipartite S unit of an ECF-type cobalt transporter, *Res Microbiol* 161 [10], Seite 824-9.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Soding, J.; Thompson, J. D. und Higgins, D. G. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol Syst Biol* 7, Seite 539.
- Sippach, M.; Weidlich, D.; Klose, D.; Abe, C.; Klare, J.; Schneider, E. und Steinhoff, H. J. (2014): Conformational changes of the histidine ATP-binding cassette transporter studied by double electron-electron resonance spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* 1838 [7], Seite 1760-8.
- Slotboom, D. J. (2014): Structural and mechanistic insights into prokaryotic energy-coupling factor transporters, *Nat Rev Microbiol* 12 [2], Seite 79-87.
- Smith, P. C.; Karpowich, N.; Millen, L.; Moody, J. E.; Rosen, J.; Thomas, P. J. und Hunt, J. F. (2002): ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer, *Mol Cell* 10 [1], Seite 139-49.
- Soumian, S.; Albrecht, C.; Davies, A. H. und Gibbs, R. G. (2005): ABCA1 and atherosclerosis, *Vasc Med* 10 [2], Seite 109-19.
- Stolz, J. (2003): Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast* 20 [3], Seite 221-31.
- Stolz, Jürgen; Hoja, Ursula; Meier, Sandra; Sauer, Norbert und Schweizer, Eckhart (1999): Identification of the Plasma Membrane H⁺-Biotin Symporter of *Saccharomyces cerevisiae* by Rescue of a Fatty Acid-auxotrophic Mutant, *Journal of Biological Chemistry* 274 [26], Seite 18741-18746.
- Stolz, W. (2005): Radioaktivität. Grundlagen, Messung, Anwendungen. 5.
- Story, R. M.; Bishop, D. K.; Kleckner, N. und Steitz, T. A. (1993): Structural relationship of bacterial RecA proteins to recombination proteins from bacteriophage T4 and yeast, *Science* 259 [5103], Seite 1892-6.
- Sutcliffe, I. C. und Russell, R. R. (1995): Lipoproteins of gram-positive bacteria, *J Bacteriol* 177 [5], Seite 1123-8.
- Swier, L. J.; Guskov, A. und Slotboom, D. J. (2016): Structural insight in the toppling mechanism of an energy-coupling factor transporter, *Nat Commun* 7, Seite 11072.

- Tang, Q.; Li, X.; Zou, T.; Zhang, H.; Wang, Y.; Gao, R.; Li, Z.; He, J. und Feng, Y. (2014): *Mycobacterium smegmatis* BioQ defines a new regulatory network for biotin metabolism, *Mol Microbiol*.
- ter Beek, J.; Duurkens, R. H.; Erkens, G. B. und Slotboom, D. J. (2011): Quaternary structure and functional unit of energy coupling factor (ECF)-type transporters, *J Biol Chem* 286 [7], Seite 5471-5.
- ter Beek, J.; Guskov, A. und Slotboom, D. J. (2014): Structural diversity of ABC transporters, *J Gen Physiol* 143 [4], Seite 419-35.
- Theodoulou, F. L. und Kerr, I. D. (2015): ABC transporter research: going strong 40 years on, *Biochem Soc Trans* 43 [5], Seite 1033-40.
- Tomii, K. und Kanehisa, M. (1998): A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes, *Genome Res* 8 [10], Seite 1048-59.
- Urbatsch, I. L.; Sankaran, B.; Bhagat, S. und Senior, A. E. (1995): Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active, *J Biol Chem* 270 [45], Seite 26956-61.
- Urbatsch, I. L.; Sankaran, B.; Weber, J. und Senior, A. E. (1995): P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site, *J Biol Chem* 270 [33], Seite 19383-90.
- van Veen, H. W.; Callaghan, R.; Soceneantu, L.; Sardini, A.; Konings, W. N. und Higgins, C. F. (1998): A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene, *Nature* 391 [6664], Seite 291-5.
- Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M. J. und Gay, N. J. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold, *Embo j* 1 [8], Seite 945-51.
- Wan, L.; Liang, X. und Huang, Y. (2009): Characterization of the ATPase activity of a novel chimeric fusion protein consisting of the two nucleotide binding domains of MRP1, *Arch Biochem Biophys* 485 [2], Seite 102-8.
- Wang, T.; de Jesus, A. J.; Shi, Y. und Yin, H. (2015): Pyridoxamine is a substrate of the energy-coupling factor transporter HmpT, *Cell Discov* 1, Seite 15014.
- Wang, T.; Fu, G.; Pan, X.; Wu, J.; Gong, X.; Wang, J. und Shi, Y. (2013): Structure of a bacterial energy-coupling factor transporter, *Nature* 497 [7448], Seite 272-6.
- Wen, Po-Chao und Tajkhorshid, Emad (2014): Multiple Membrane-Compatible Conformations of an Substrate-Binding Component of ECF Transporters, *Biophysical Journal* 106 [2], Seite 790a.
- Westerfeld, C. und Mukai, S. (2008): Stargardt's disease and the ABCR gene, *Semin Ophthalmol* 23 [1], Seite 59-65.

- Wiederstein, M. und Sippl, M. J. (2007): ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res* 35 [Web Server issue], Seite W407-10.
- Wuttge, S.; Licht, A.; Timachi, M. H.; Bordignon, E. und Schneider, E. (2016): Mode of Interaction of the Signal-Transducing Protein EIIA(Glc) with the Maltose ABC Transporter in the Process of Inducer Exclusion, *Biochemistry* 55 [38], Seite 5442-52.
- Xu, K.; Zhang, M.; Zhao, Q.; Yu, F.; Guo, H.; Wang, C.; He, F.; Ding, J. und Zhang, P. (2013): Crystal structure of a folate energy-coupling factor transporter from *Lactobacillus brevis*, *Nature* 497 [7448], Seite 268-71.
- Yakhnin, H.; Zhang, H.; Yakhnin, A. V. und Babitzke, P. (2004): The trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis* regulates translation of the tryptophan transport gene *trpP* (*yhaG*) by blocking ribosome binding, *J Bacteriol* 186 [2], Seite 278-86.
- Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J. und Zhang, Y. (2015): The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction, *Nat Methods* 12 [1], Seite 7-8.
- Yu, Y.; Zhou, M.; Kirsch, F.; Xu, C.; Zhang, L.; Wang, Y.; Jiang, Z.; Wang, N.; Li, J.; Eitinger, T. und Yang, M. (2014): Planar substrate-binding site dictates the specificity of ECF-type nickel/cobalt transporters, *Cell Res* 24 [3], Seite 267-77.
- Zaitseva, J.; Jenewein, S.; Jumpertz, T.; Holland, I. B. und Schmitt, L. (2005): H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB, *Embo j* 24 [11], Seite 1901-10.
- Zempleni, J. und Kuroishi, T. (2012): Biotin, *Adv Nutr* 3 [2], Seite 213-4.
- Zempleni, J.; Liu, D.; Camara, D. T. und Cordonier, E. L. (2014): Novel roles of holocarboxylase synthetase in gene regulation and intermediary metabolism, *Nutr Rev* 72 [6], Seite 369-76.
- Zhang, M.; Bao, Z.; Zhao, Q.; Guo, H.; Xu, K.; Wang, C. und Zhang, P. (2014): Structure of a pantothenate transporter and implications for ECF module sharing and energy coupling of group II ECF transporters, *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 [52], Seite 18560-5.
- Zhang, P. (2013): Structure and mechanism of energy-coupling factor transporters, *Trends Microbiol* 21 [12], Seite 652-9.
- Zhang, P.; Wang, J. und Shi, Y. (2010): Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter, *Nature* 468 [7324], Seite 717-20.
- Zhang, Y.; Rodionov, D. A.; Gelfand, M. S. und Gladyshev, V. N. (2009): Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization, *BMC Genomics* 10, Seite 78.
- Zhao, Q.; Wang, C.; Wang, C.; Guo, H.; Bao, Z.; Zhang, M. und Zhang, P. (2015): Structures of FolT in substrate-bound and substrate-released conformations reveal a gating mechanism for ECF transporters, *Nat Commun* 6, Seite 7661.

Anhang

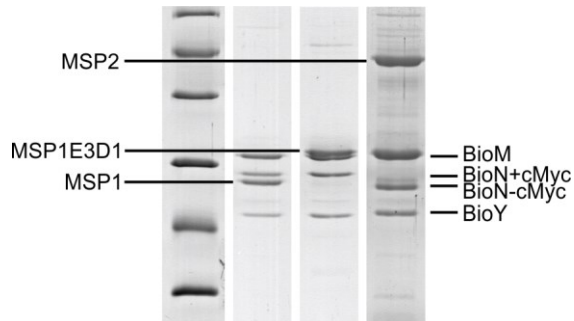


Abb. 36: Vergleich der Nanodisc-Transporter-Stöchiometrie mit unterschiedlichen Gürtelproteinen.

Gezeigt sind repräsentative Nanodiscs-Präparate mit MSP1, MSP1E3D1 oder MSP3 nach Solubilisierung und Auftrennung per SDS-PAGE und Coomassiefärbung. Größere MSP-Derivate führten nicht zum Einbau von mehr als einem BioM₂NY-Komplex pro Nanodisc, das Verhältnis von BioM zu MSP (per Pixelanalyse quantifiziert) war in allen Fällen etwa 1. Die schnellere Laufform von BioN im rechten Gel ist auf die Nutzung einer Transporter-Variante zurückzuführen, deren BioN-Komponente keinen C-terminalen cMyc-Tag trug.

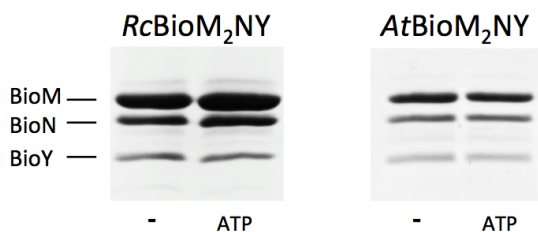


Abb. 37: Komplexstabilität von *RcBioM₂NY* und *AtBioM₂NY* nach ATP-Zugabe. Die Transporter-Komplexe (etwa 2,5 µM) wurden mit 250 µl Ni-NTA-Agarosematrix inkubiert und optional mit ATP versetzt. Nach Waschen der immobilisierten Komplexe mit je zwei Säulenvolumen Waschpuffer (vgl. Abschnitt 4.13.5) mit 25 mM Imidazol wurden die Proteine eluiert, konzentriert und per SDS-PAGE analysiert. Die alleinige Zugabe von ATP hatte bei beiden Transporter-Komplexen keinen Einfluss auf die Interaktion mit BioY.

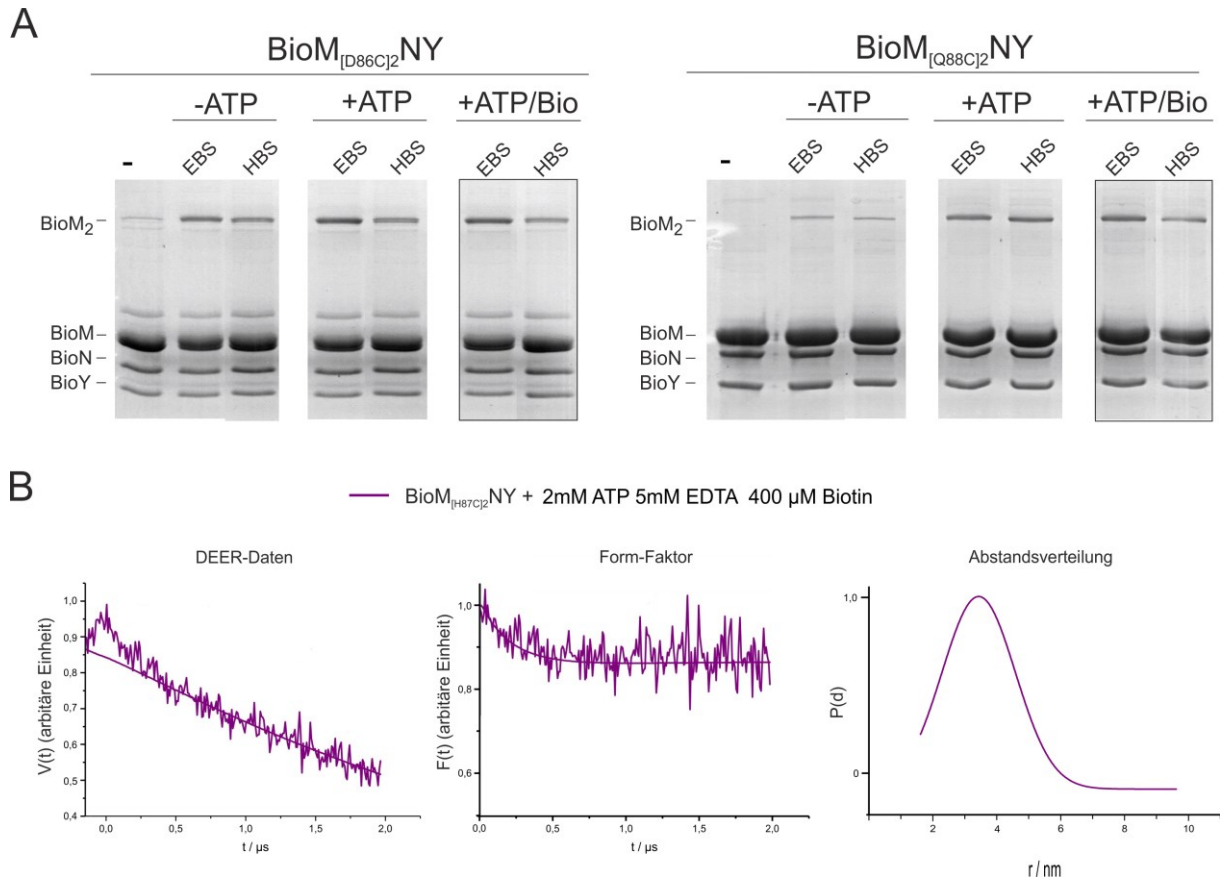


Abb. 38: Einfluss der Biotinbindung auf den Abstand des ATP-gebundenen BioM-Dimers. **A)** Die Abbildung stellt eine Erweiterung der unter Abschnitt 2.5 vorgestellten Ergebnisse zur längenspezifischen Quervernetzung der Q-Helices in BioM₂ über die Positionen 86/86' bzw. 88/88' dar (vgl. **Abb. 14**). Die eingerahmten Abschnitte zeigen den Grad der Quervernetzung des ATP-gebundenen BioM-Dimers unter dem Einfluss von Biotin. Während die Vernetzung der Positionen 86/86' nicht durch Biotin beeinflusst wurde, deutete der Grad der Quervernetzung zwischen den Positionen 88/88' mit EBS und HBS auf eine Abstandsverringerung hin, da das EBS-spezifische Produkt verstärkt, das HBS-spezifische Produkt dagegen geschwächt wurde. **B)** Die Analyse des in den Q-Helices an Position 87/87' spinmarkierten BioM₂NY-Komplexes in Nanodiscs lieferte einen Abstand, der mit etwa 34 Å dem des Apo-Zustands entsprach. Dies deutete darauf hin, dass das ATP-gebundene BioM-Dimer an diesen Positionen nach Biotinbindung leicht geöffnet wurde (vgl. **Abb. 15**).



Abb. 39: Aminosäuresequenzvergleich von *RcBioM* mit kristallisierten ECF-ATPasen. Das Alignment zeigt die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von *RcBioM* mit den Aminosäuresequenzen der kristallisierten ECF-ATPasen *TmEcfA1*, *A2* (pdb-Codes 4HLU/4ZIR), *LbEcfA1*, *A2* (pdb-Codes 4HUQ/4HZU/4RFS), *LdEcfA1*, *A2* (pdb-Codes 5JSZ/5D3M) und *CpCbiO* (pdb-Code 3GFO) im Bereich der Q-Helix und des Signaturmotivs. Der kurze Abschnitt vor der Q-Helix, der einen konservierten Glutaminrest enthält, entspricht dem Q-Loop kanonischer ABC-ATPasen. Die hellblau umrahmten Positionen in *RcBioM* (Asp-86 und Arg-141) entsprechen den Positionen in *TmEcfA2*, zwischen denen eine Salzbrücke als „molekulare Bremse“ der ATP-Hydrolyse vorgeschlagen worden war (Karpowich und Wang, 2013). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Clustal Omega-Algorithmus (Sievers et al., 2011) durchgeführt.

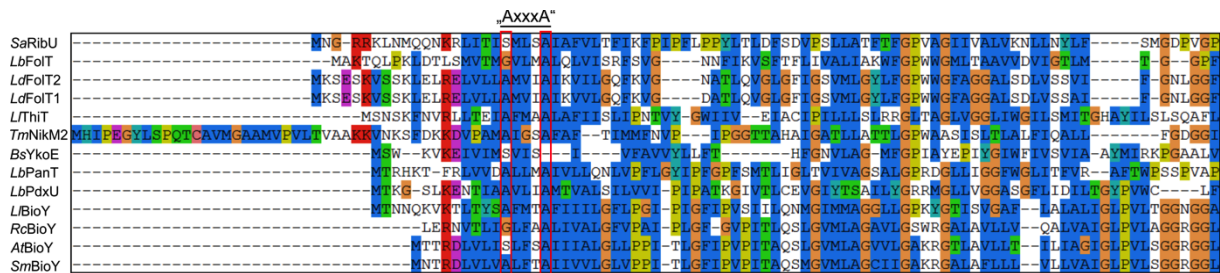


Abb. 40: N-terminaler Aminosäuresequenzvergleich von *RcBioY*, *AtBioY*, *SmBioY* mit allen bisher kristallisierten S-Einheiten. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei BioY-Proteine mit den Aminosäuresequenzen aller kristallisierten S-Einheiten deutete darauf hin, dass das Interaktionsmotiv in TMH1 (rot umrahmt) in *RcBioY* die Sequenz G_{9xxx}A₁₃ tragen und damit weiter in Richtung des N-Terminus verschoben liegen könnte als ursprünglich vorgeschlagen (Kiesler, 2013). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Clustal Omega-Algorithmus (Sievers et al., 2011) durchgeführt.

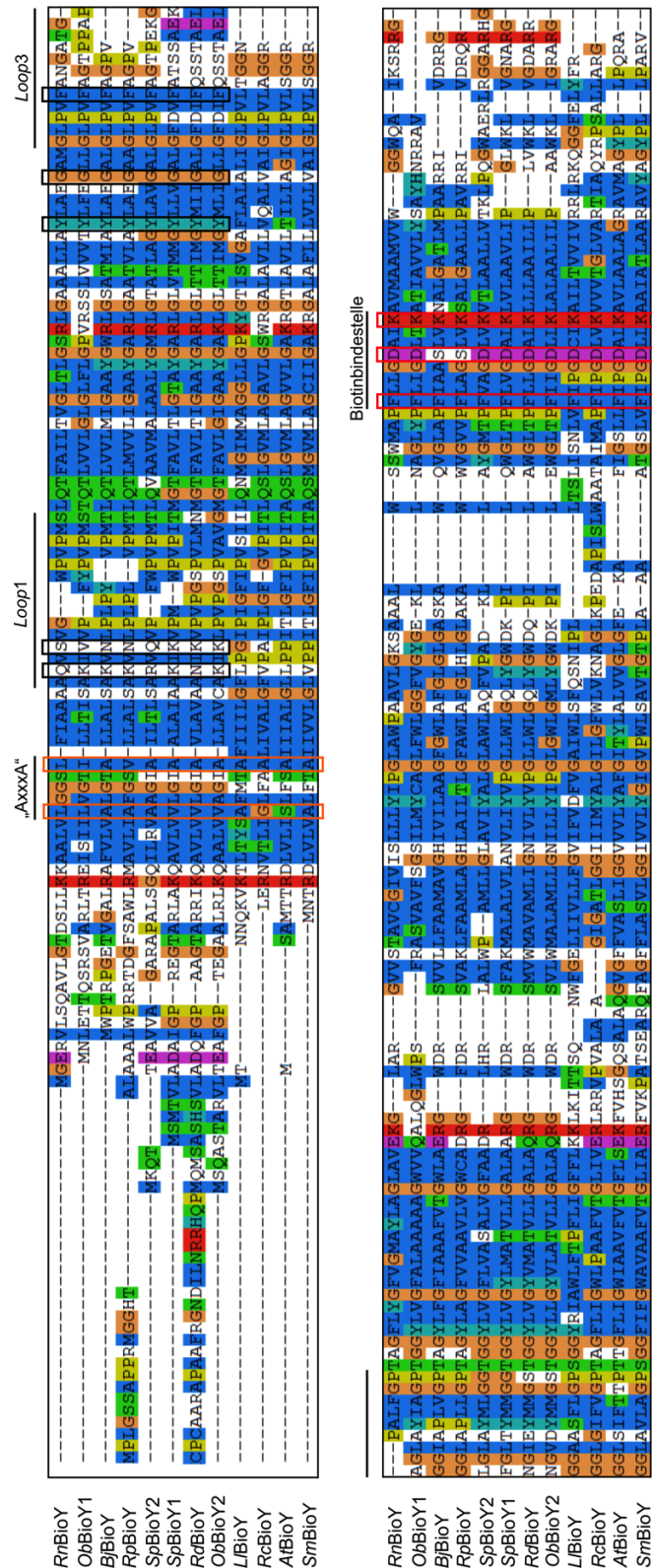


Abb. 41: Aminosäuresequenzvergleich der dieser Arbeit untersuchten BioY-Proteine mit L/BioY. Das hydrophobe Motiv in TMH1 wurde auf Basis des Sequenzvergleiches in Abb. 40 gewählt und orange umrahmt. Aminosäurereste, die nur in den solitären BioY-Proteinen vorkommen, sind schwarz, die an der Biotinbindung beteiligten konservierten Reste (Berntsson et al., 2012; Kirsch et al., 2012) sind rot markiert.

Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Thomas Eitinger für die Möglichkeit, meine Dissertation über dieses spannende Thema in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen zu können, für die engagierte Betreuung und den regen Austausch mit einer jederzeitigen Bereitschaft zu Diskussionen.

Weiterhin danke ich den Herren Prof. Dr. Erwin Schneider und Prof. Dr. Heinz-Jürgen Steinhoff für die fruchtbare Kooperation und die bereitwillige Übernahme der Gutachten. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Schneider für die vielen Anregungen und kritischen Diskussionen aus dem Blickwinkel seiner langjährigen Erfahrung auf dem Forschungsgebiet der ABC-Transporter.

Insbesondere danke ich: Heidi Landmesser (Bakterienphysiologie, HU Berlin) für die experimentelle Unterstützung und Bereitstellung nahezu unerschöpflicher Mengen des Gürtelproteins für die Präparation von Nanodiscs; Michael Sippach (Makromolekülstruktur/Experimentalphysik, Uni Osnabrück) für die Durchführung der ESR-Messungen; Dr. Berta Martins (Strukturbiologie/Biochemie, HU Berlin) für die freundliche Zusammenarbeit bei der Kristallisation von BioY-Proteinen.

Ich danke außerdem Cornelia Kiesler, Anastasia Ogienko und Miriam Grunzel, die als Studentinnen im Rahmen ihrer Bachelor- und Masterarbeiten einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Besonderer Dank gilt Dr. Franziska Kirsch und Dr. Olivia Neubauer, die mich in das Labor, die Thematik und in experimentelle Methoden eingearbeitet haben. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich außerdem bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich, Herrn Dr. Oliver Lenz und Frau Prof. Dr. Regine Hengge für die angenehme gemeinsame Zeit.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei Marie und Carla für ihre Geduld und Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 11.01.2017

Friedrich Finkenwirth